

**First name & last name:** Luigi Faino

**Supervisor:** Prof. Domenico Carputo

**Co-supervisor:** Dott.ssa Maria Raffaella Ercolano

**University & Department:** Università degli Studi di Napoli "Federico II", Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali

**Title:**

**Biotechnological approach to the study *Tomato-Phytophthora infestans* and Tomato-*Oidium neolycopersici* pathosystems**

Abstract

The first aim of this PhD thesis was to dissect the role of Quantitative Trait Loci (QTLs) involved in the resistance to *Oidium neolycopersici* identified in tomato wild species *Solanum neorickii* G1.1061. A F<sub>2</sub> population and several advanced backcrosses (BC) originated from cross between *S. neorickii* and the susceptible *S. lycopersicon* cv Monyemaker, were used to fine map *Ol-qt12* and *Ol-qt13* loci using CAPS markers. The location of *Ol-qt12* on chromosome 12, narrowed down in a region of 8 cM, explains 30% of the phenotypic variation. *Ol-qt13* was a false positive. The *Ol-qt12* locus was associated to a region where the *Lv* gene (conferring resistance to *Leveillula taurica*) is located. To clone the QTL a genetic and physical mapping approach in the region of interest was performed. An epistatic locus that interact with the *Ol-qt12* on chromosome 3 of *S. neorickii* was also identified. The second aim was to explore the interaction system tomato-late blight. In particular, tomato plants transformed with the *R1* gene were inoculated with the host and the non-host pathogen races. The *R1* resistance gene transcribes for a protein that confer resistance to *P. infestans* race 1 in potato (Ballvora *et al.* 2002). A Suppression Subtractive Hybridization (SSH) was used to generate a cDNA library enriched for sequences transcriptin a resistant *R1*-tomato plants inoculated with late blight. A total of 100 clones were obtained and 82 partial cDNA sequences were submitted to international database (Solanaceae Genomic Network; SGN: <http://www.sgn.cornell.edu> and National Center for Biotechnology Information; NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> ). Fifty-six sequences showed similarity to plant annotated sequences. Of these, 39% were previously characterized as either defense- or stress-associated genes. A fine annotation was performed for each gene. The aim of this experiment was to understand which gene/s was/were involved in the signal transduction process during the interaction of *R1* gene with the *P. infestans* race 1. Based on the annotation results, further analyses were conducted on ten clones. The sequences of these clones were used to design primers to perform Real Time PCR experiments. In particular, sequence 21 (*Catalase\_like*), 37 (*putative receptor-like serine-threonine protein kinase*) and 47 (*Beta glucosidase*) gave the best results.

Introduction

The tomato powdery mildew (*Oidium neolycopersici*) and the tomato late blight (*Phytophthora infestans*) are some of the most important pathogens in the world.

Till 2003 all the tomato cultivars were susceptible to tomato powdery mildew, but several kinds of resistance have been found in *Solanum* species (Ciccarese *et al.*, 1998; Lindhout *et al.*, 1994). Incomplete dominant resistant genes *Ol-1* and *Ol-3*, mapping on the short arm of chromosome 6, were found in *S. harbochautes* G1.1560 and G1.1290 (Huang *et al.*, 2000). Three different resistance QTLs, associated with the resistance, were also identified in the wild specie *S. neorickii*. The three R-QTLs showed a dominant effect on the resistance. The QTLs, located respectively on chromosome 6 and chromosome 12, were named as *Ol-qt11*, *Ol-qt12* and *Ol-qt13*. The *Ol-qt11* was co-localized with the resistance genes identified in *S. harbochautes*. The *Ol-qt12* and *Ol-qt13* were localized on the short arm of chromosome 12 at a distance of 25 cM between each other. In the same region another resistance gene (*Lv*) against *Leveillula taurica* is located (Chunwongse *et al.*, 1997). *L. taurica* is an additional causal agent of powdery mildew and it occurs in a subtropical regions. All three QTLs jointly explain the 68 % of the phenotypic variation (Bai *et al.*, 2003).

The co-localization with the major resistance loci support the hypothesis that the allelic variations of these genes can be also involved in the quantitative resistance (Caranta *et al.*, 1997; Geffroy *et al.*, 2000; Grube *et al.*, 2000). Pflieger *et al.* (2001) identified some RGAs loci co-localizing with same R-QTLs. Several studies showed the organization in cluster of the resistance genes. Some of these have proved to be functional. For instance, full resistance and partial resistance to *Fusarium oxysporum f.s. lycopersici* was conferred from different alleles at the same locus in different species. The allelic variation could be an explanation for this evidence (Sela-Buurlage *et al.*, 2001).

Several approaches were used to clone the resistance gene. The integration of physical map and genetic map was used to clone resistance genes as *R1* (Ballvora *et al.*, 2002) and *SUNN* (Schnabel *et al.*, 2003 and 2005). Integrated genetic and physical maps could be the best approach to clone identified QTLs.

*P. infestans* is a causal agent of late blight in tomato and potato. Several resistance genes have been isolated in wild *Solanum* species. Examples are the genes *Rpi-blb2* (van der Vossen *et al.*, 2005), *R3a* (Huang *et al.*, 2005) and *RB* (Song *et al.*, 2003). Unfortunately, resistance genes (major genes), giving full resistance to *P. infestans*, were not isolated in tomato wild species. Three monogenic genes *Ph-1*, *Ph-2* and *Ph-3*, conferring partial resistance to *P. infestans* in tomato wild species, and several R-QTLs in *S. harbochautes*, were identified against late blight (Brouwer *et al.*, 2004). However, with the possible exception of a gene recently found in *S. bulbocastanum* (Song *et al.*, 2003), all the resistance genes discovered until now are not effective against all *P. infestans* genotypes (Smart *et al.* 2006). Using SSH approach, many genes involved in response to potato-*P. infestans* interaction were identified (Birch *et al.*, 1999). The use of those involved in the downstream after the interaction could be a possible way to defend the plants against the pathogen.

## Materials and methods

Several populations ( $F_2$ : n=104,  $BC_2S_1$ :n=168,  $BC_3S_1$ : n=40 and  $BC_2S_2$ : n=40) derived from an interspecific cross between individual plants of the susceptible *Solanum lycopersicon* (SL) cv. Moneymaker and the resistant accession *S. neorickii* (SN) G1.1601

were used to study inheritance of the resistance. The pathogenic fungus *O. neolycopersici*, originated from infected commercial tomato plants (Lindhout et al. 1994), was used for disease test. A disease test was performed by spraying one-month-old tomato plants with a suspension of  $2 \times 10^4$  conidia per ml. Fungal growth was evaluated at 11, 14, and 19 days post inoculation (dpi) for all the populations. A disease index was used where 0 = no sporulation; 1 = slight sporulation, but less than 5% foliar area affected; 2 = moderate sporulation, 5 to 30% foliar area affected; 3 = abundant sporulation, more than 30% foliar area affected. Molecular analysis using AFLP was performed on DNA extracted from the parents and segregating individuals as described by Vos and associates (1995), with some modifications. CAPS markers were developed, using different sources to design the primer, for the region of interest. JoinMAP4 was used to generate the map applying the Kosambi's mapping function. QTL mapping analysis was performed using MapQTL5 with a LOD threshold value of 3. An integrated map was produced using the common marker between the tomato-EXPEN2000 and *S. neorickii* x *S. lycopersicon* maps. In addition, a physical mapping of *Ol-qt12* locus was also performed.

The progeny (L17) of tomato transformed with the resistance gene *R1* was used in disease test with the race 1 and race 0 of *P. infestans*. The disease test was performed using zoospore and mycelium disc applied on leaf of tomato-*R1*. The test was made in-vitro to normalize the condition. Three different time points were chosen to investigate the HR evolution (0.5 hours post inoculation (hpi), 3 hpi and 6 hpi). RNA at three time points was extracted with the RNASE mini kit from QIAGEN. The RNA, for the SSH (CLONTECH) experiment, was extracted using the samples with the same amount of race 0 and 1 zoospores at 6 hpi. The RNA extracted from the tomato-*R1* inoculated leaves with the race 0 of *P. infestans* was the subtracted sample (drive) and the RNA extracted from the tomato-*R1* inoculated with the race 1 was the enriched sample (tester). The library was made by TA cloning vector (INVITROGEN) and the clones were sequenced by A&B 3100 sequencer. The PCR and Real Time PCR were conducted using a single strand cDNA produced by SuperScriptIII kit (INVITROGEN) from three time points for each compatible and incompatible interactions. The stock solution of cDNA was diluted till a solution of 10 pg of cDNA. The reactions were ran by using 1.3mM of primers with a Eppendorf thermocycler and the results analyzed by iQ5 software.

## Results

### Tomato Vs *Oidium neolycopersici*

#### *Ol-qt12* mapping

Four different populations were used for fine mapping the *Ol-qtl*s located on chromosome 12 (Bai *et al.*, 2003). Quantitative *O. neolyticopersicy* tests were performed on these plants using a disease index (D.I.) to score the infection rate. The resistant parental SN showed full resistance (D.I.=0), while the susceptible SL parental susceptibility (D.I.=3). One BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>(POP A) and three BC<sub>2</sub>S<sub>2</sub> populations were used to fine map the *Ol-qtl*s. The BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> POP A showed a D.I. range between 0.5 and 3. It was used to narrow down the location of the two QTLs. CAPS markers were developed to saturate the region between the marker T0656 and TG111 associated with the *Ol-qtl2* and the *Ol-qtl3*. Twenty-one co-dominant CAPS marker were applied on the BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> (n=168) population, segregating for the *Ol-qtl*s, to make a CAPS linkage group and to narrow down the size of this region. The marker disposition on chromosome 12 was in agreement with the SGN tomato-EXPEN2000 map except for markers T0659 and TG180. In fact, in this region an inversion between SL and SN was found. Interval map analysis, conducted on the BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> data using MapQTL software, identified only one *Ol-qtl* (*Ol-qtl2*) for resistance against *O. neolyticopersici*. The logarithm of odds (LOD) of this QTL was 9 times higher of the threshold limits (threshold=3). The new QTL region was delimited between the marker TG180 and T1185 (45cM) and the peak has the maximum between the marker CT129 and cLET-8-k4, in a tiny interval of 1.3 cM. In this population both markers explain 30 % of the phenotypic variation.

To fine map the *Ol-qtl2* the three BC<sub>2</sub>S<sub>2</sub> recombinant families (RF) originated from selfing of three BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> individuals (121, 22 and 103) were chosen. Each family segregated for a sub-interval of the *Ol-qtl2* region. Having the genotypic constitution of the selected individuals at the *Ol-qtl2* interval and also phenotypic and genotypic data of its selfing progenies, we aimed at localizing *Ol-qtl2* in a smaller genetic interval assuming that selfing progenies of a selected individual should not segregate phenotypically. In particular if *Ol-qtl2* gene was located in the region homozygous for G1.1606 allele, should show overall resistance phenotype. By contrast, if *Ol-qtl2* gene was located in the region homozygous for MM allele, selfing progenies should show overall susceptibility phenotype. Selfing progenies should segregate phenotypically, if *Ol-qtl2* gene was located in the heterozygote region. One-way ANOVA using DI data of RF121 showed significant effect of the segregating region flanked by markers c2\_At2g06530 and TG111 on the resistance phenotype. DI of the RF121 plants varied between 0.7 and 3.0 (Mean = 1.75, SD = 0.60). Analyzing the data from RF22 using the same method, significant effect of the interval between CT79 and T1263 on the resistance phenotype was also detected. DI of progenies ranged from 0.1 to 2.2 (Mean = 1.25, SD = 0.58). Segregating data analysis on the RF103 did not reveal any significant co-segregation of maker alleles between cLET-8-K4 and Y258 (interval determining the putative *Ol-qtl3*) with the phenotypic score (Mean = 2.5, SD = 0.42). In light of the above reported results, *Ol-qtl2* interval was delimited by two markers, c2\_At2g06530 and T1263, spanning around 8cM of tomato chromosome 12. This interval could be finer to a minimum size of 4.4cM if more information on the position of cross-overs could be obtained by the development of new markers in corresponding regions. Detected fine interval, also called *Ol-qtl2*, replaced the previous broad 45cM interval on chromosome 12. Results also denied any effect of the lower part containing Y258 on resistance phenotype which had been reported to be linked with *Ol-qtl3* (Bai *et al.*, 2003). Therefore, *Ol-qtl3* is eliminated from the research in further stages.

An integrated physical and genetic map was made for the *Ol-qtl2* locus. This new map localize a contig of BACs in a region where, using MapQTL5, there is a high probability of QTL presence. The analysis conducted on the contig sequence showed the presence of *Cf* genes analogue. In particular, three different homologues of *Cf* resistance genes in a region of 250 kb were found. PCR on the gDNA and cDNA showed an amplicon with a right size and the expression of this sequence at the cDNA level. The sequencing of these

fragments confirmed that the expressed sequence match with the sequence of chromosome 12 in a analyzed contig BACs. Further analysis showed that the sequenced fragment from *S. neorickii* do not have a perfect identity with the BAC sequence. This evidence supports the presence of genomic differences between the species in the chromosome region delimited from the markers C2\_At2g06530 and T1263.

### Epistatic locus

AFLP fingerprinting of parents and bulks from resistant and susceptible BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> individuals was carried out with 42 *MseI* / *EcoRI* and one *PstI* / *MseI* primer combinations (PC) to identify candidate markers associated with powdery mildew resistance. It was expected that candidate markers in coupling phase show bands in resistant parent and R-bulk but not in the susceptible parent and S-bulk and vice versa for markers in repulsion phase. Thirty six PCs were reliably scored with an average of 61 bands per PC. In total 1340 polymorphic bands (61% of the total bands) were scored between parental lines, 718 bands originating from the resistant parent (SN) and 622 bands originating from the susceptible parent (SL).

AFLP analysis of bulks with polymorphic bands did not result in detection of present/absent band pattern but patterns with strong bands in R-bulk and weak bands in the S-bulk. It brought up the idea of existing DNA of very few resistant individuals in the susceptible bulk (most likely heterozygous). Seventeen polymorphic bands in ten primer combinations were inferred as putative markers linked with the resistance allele and used to screen individuals and pre-NILs separately. Twelve of seventeen putative markers (0.9% of the polymorphic bands) were confirmed by screening individuals and pre-NILs and designated as “candidate markers”. Candidate markers were all resistant parent originating bands (in coupling phase) and showed the same segregation pattern on parents, pre-NILs and individuals. The size of the fragments as candidate markers varied between 140 and 478 bp.

The PC E35M52 showed three different polymorphic bands of “candidate markers”. AFLP analysis was conducted on the F<sub>2</sub> population between SL x SN (Bai *et al.*, 2003) using these three polymorphic markers. These markers were scored as dominant markers and the results were included in the previously made F<sub>2</sub> map. These AFLP markers were clustered in a linkage group localized on chromosome 3 of tomato. To confirm this results, CAPS markers were developed in the region close to the “candidate markers”. The CAPS markers showed the same order compared to the tomato-EXPEN2000 map in the SGN database and all the three AFLP markers were linked to a specific chromosome 3 marker on the long arm. To have a simpler marker linked to the putative epistatic locus, one AFLP marker was converted in CAPS (SN280) marker. The integration of SN280 in the F<sub>2</sub> map showed that this marker co-localize with the marker C2\_At5g38880. In addition, all the AFLP “candidate markers” and the SN280 were clustered between the TG599 and the C2\_At5g38880 in a range of 9 cM. Bioinformatics approach was used for the physical localization of SN280. The sequence of this marker was aligned in a SGN BAC-ends database and two perfect matches were found. The BAC-end sequences were used to design a combination of primers and applied to the F<sub>2</sub> population. The results after the mapping localized the BAC Le\_Hba116a06 on the chromosome 3 in a region close to the marker SN280. In this way, the BAC was localized on the tomato physical map in the region of interesting.

The population RF22 was used to confirm the data for the putative epistatic locus. Forty plants were grown to conduct disease tests and molecular analyses. All the plants showed a resistant phenotype with a population average D.I. around 1. In addition, this population segregated for the *Ol-qt12* locus on chromosome 12. Further, PCR analysis using

C2\_At5g38880 on this population, showed that all the plants were homozygous for the SN allele at this locus. Also RF59 population (n=40), derived from the individual 59 in the BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>, showed segregation for the *Ol-qt12* locus. However after the disease tests all the plants gave a susceptible phenotype with an average D.I. of 2.9. Further PCR analysis using the TG599 CAPS marker showed homozygosity for the SL allele for all the plants in the population. Finally, a BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub> (n=40) population was also analyzed genetically and phenotypically. The individuals of this population were all susceptible with an average D.I. of 2.9. At the genetic level the plants were all homozygous for the susceptible epistatic allele, while showed a segregation for the *Ol-qt12* locus.

### Tomato Vs *Phytophthora infestans*

Tomato plants transformed with the resistance gene *R1* were selfed to produce a progeny. The progeny L17 was used in a disease test. Plants showing the presence of the *R1* gene were inoculated the race 1 and the race 0 of *P. infestans*. A SSH was used to generate a cDNA library enriched for sequences induced in a late-blight-resistant tomato-*R1* undergoing the Hypersensitive response (HR). One hundred colonies were obtained and cloned in TA cloning vector. Eighty-two partial cDNA sequences were sequenced and then submitted to international database (Solanaceae Genomic Network), 56 of them showed similarity to plant genes already annotated. Of these 39% were previously characterized as either defense- or stress-associated genes. Based on the annotation further studies were conducted on ten clones. The sequences of these clones were used to design a primer to perform Real Time PCR experiments. To understand the HR evolution also other genes, known to be involved in disease process, as the *Pr1* (*Pathogenesis Related 1 protein*) and the *PAL* (*Phenil-alanil Ammonio Lyase*) were investigated and used as controls. Interesting results were obtained for clones 21, 37 and 47. The 21 sequence was analyzed using different database in the SGN. This sequence was annotated as a *Catalase\_1* like of tomato and localized on the C12Hba0115G22 associated to the long arm of chromosome 12. The Transcript Derived Sequence (TDF) 21 was studied by Relative Real Time PCR using the gene Elongation Factor 1 as housekeeping gene. The TDF21 was found to be more expressed in the incompatible interaction in all the time points (3hpi and 6hpi). Although the expression of the TDF 21 was lower than the *Pr1* and *PAL* at 0.5 hpi, while its expression increased at 6 hpi at same expression of *Pr1* and *PAL*. The TDF 37 had an homology with a *serine-threonine protein kinase* involved in interaction protein-protein. The results from the Real Time PCR showed the high expression of this gene at 0.5 hpi comparable with *PAL* and *Pr1* (2.5 fold the *EF1* gene). At the 2<sup>nd</sup> time point (3hpi) a high expression of this TDF in the incompatible interaction was clear, although at 6 hpi the expression was higher in compatible interaction.

The sequence 47 had an homology with a *Beta glucosidase* gene involved in plant pathogen interaction. The expression of this gene at 0.5 hpi is much lower than *Pr1* and *PAL*, but it had the same level of transcript at 6 hpi. In addition, the graph showed a difference between the time points at 3 and 6 hpi.

### Importanza economica del pomodoro

Il pomodoro è uno degli ortaggi più importanti al mondo. Nel 2006 la produzione globale di pomodoro si è aggirata intorno alle 1.26 x 10<sup>8</sup> tonnellate, di cui il 19.8% in Italia (FAOSTAT, 2006). Questa specie appartiene alla famiglia delle Solanaceae (dal latino *solari*), che comprende circa 90 generi e 3000-4000 specie. Economicamente le Solanaceae rappresentano la terza famiglia più importante nel mondo vegetale. Essa include specie utilizzate nell'industria (tabacco), specie alimentari (pomodoro, melanzane e patate), specie ornamentali (petunia) e specie usate in medicina (*Capsicum* e *Datura*).

Molte Solanaceae sono utilizzate come piante modello. Alcuni esempi sono il pomodoro (per studiare la maturazione e l'interazione pianta patogeno), il tabacco (per le colture cellulari, per la trasformazione genetica, per interazione pianta patogeno e per i Virus Induced Gene Silencing: VIGS), la patata (per la ricerca sull'amido) e la petunia (per ricerche sugli antociani). Per tutte queste caratteristiche, le Solanaceae sono uno dei gruppi più studiati tra le angiosperme. Recentemente le relazioni filogenetiche nella famiglia sono state modificate basandosi sulle sequenze cloroplastiche del gene *ndhF* ed il genere *Lycopersicon* è stato integrato con il genere *Cyphomandra* dando origine al genere *Solanum* (Bohs & Olmstead, 1997). Altri studi sulle relazioni filogenetiche tra le specie nell'ambito del genere, attraverso comparazione di AFLP "fingerprinting" e altri marcatori, hanno portato alla nuova nomenclatura nel genere *Solanum*. Nell'ambito di questo genere possiamo distinguere la sezione *Lycopersicum* (licopersicoidi). Le specie appartenenti a questa sezione sono molto diffuse in tutta la regione del Sud America. Le specie selvatiche di pomodoro crescono in una varietà di habitat differenti, che vanno dal livello del mare agli altopiani delle Ande (3300 metri s.l.m.) adattandosi molto velocemente ai differenti microambienti. Queste caratteristiche rendono i licopersicoidi specie molto adattabili a diverse condizioni ambientali e quindi capaci di "colonizzare il mondo" (Peralta & Spooner, 2000). Un'ulteriore classificazione divide i licopersicoidi in due "complex". Il primo gruppo (*esculentum* complex) racchiude *Solanum lycopersicum*, *S. pimpinellifolium*, *S. cheesmaniae*, *S. chmielewskii*, *S. neorickii*, *S. habrochaites* e *S. pennellii*, mentre nel secondo sono presenti due specie molto lontane dalle altre *S. peruvianum* e *S. chilense*. Questa distinzione è molto importante ai fini del miglioramento genetico dato che incroci tra specie appartenenti a differenti "complex" sono molto difficili (Rick, 1982). Molti geni economicamente importanti, come tutti i maggiori geni di resistenza, sono identificati nelle specie selvatiche del genere *Solanum* (Rick & Yoder, 1988).

Il progenitore del pomodoro coltivato è stato individuato in *Solanum lycopersicum* var *cerasiforme*. Il pomodoro coltivato (*S. lycopersicum* L.) è specie pluriennale nella regione delle Ande dove si è diversificato (Peralta & Spooner, 2000). Il Messico è la regione dove è stata iniziata la domesticazione del pomodoro (Picken *et al.*, 1985; Taylor, 1986). Importato in Europa nel XV secolo, ha subito i maggiori processi di domesticazione in Italia. Agli inizi del 1900 uno sfrenato lavoro di domesticazione e di miglioramento genetico è stato condotto sul pomodoro. In particolare, i "breeder" hanno lavorato per ottenere rese più alte, differenti forme e colori dei frutti e portamenti più adatti all'agricoltura in base alle diverse esigenze (Bai *et al.*, 2007). La domesticazione e l'intensiva coltivazione hanno portato, verso la fine del XX secolo, alla produzione di cultivar sempre più produttive, ma con scarsa resistenza ai patogeni. Infatti, in molti casi la resistenza è associata a caratteristiche non desiderate e quindi la selezione ha portato alla produzione di popolazioni molto suscettibili. Tipici esempi sono gli ecotipi San Marzano e Sorrento. Oggi possiamo scegliere tra una quantità infinita di varietà di pomodoro. Si distinguono due tipologie di pomodoro in base all'utilizzo. La prima, molto usata nell'industria di trasformazione, presenta frutti tondo-globosi, lisci o costolati, di varia dimensione; queste caratteristiche molto apprezzate sono tipiche delle cultivar Marmande, Moneymaker, Early Pack e di alcuni ibridi come Colibrì e Brillante. Alla seconda tipologia appartiene il San Marzano, molto utilizzato per il consumo fresco, di forma cilindrico-piriforme. È molto noto ed apprezzato, ma si adatta male alla coltura in pieno campo in quanto necessita di sostegni; per questo motivo è stato sostituito da ibridi a portamento determinato. Il consumo di pomodoro riveste una notevole importanza nella dieta mediterranea in quanto rappresenta una importante fonte di vitamine e antiossidanti. Sono stati condotti molti studi per valutare i potenziali benefici associati al suo consumo. I composti antiossidanti più importanti, presenti nelle bacche, sono i carotenoidi, i polifenoli e i folati. Il frutto del pomodoro è la principale fonte di licopene, di beta-carotene e di altre sostanze che hanno

funzione antiossidante. Il contenuto di licopene varia da 30 a 400 mg/kg di prodotto fresco. A differenza di quello derivante da altre specie vegetali, il licopene del pomodoro è facilmente assimilato dall'organismo umano, in buona parte allo stato fresco, e quasi totalmente quando le bacche sono sottoposte all'azione del calore. Il licopene fornisce una valida protezione contro diversi tumori epiteliali, ha il potere di prevenire alcuni tipi di cancro, altre malattie cardiovascolari e di ritardare l'invecchiamento delle cellule del nostro corpo. Il beta-carotene è un precursore della vitamina A, la quale impedisce l'ossidazione della vitamina C, a sua volta fondamentale nei processi antiossidanti.

In Italia è stato stimato che circa il 15-20% del prodotto commerciabile è perso a causa di attacchi di parassiti di varia natura. Per cercare di fare fronte a queste perdite di produzione le ditte sementiere e la ricerca pubblica, attraverso il miglioramento genetico, si stanno impegnando per selezionare nuove varietà resistenti a diversi patogeni.

### Il pomodoro e il miglioramento genetico.

Il pomodoro coltivato è una pianta autogama diploide a 24 cromosomi e ha un genoma relativamente piccolo (circa 950Mb/genoma alpolide). Per queste due caratteristiche risulta essere molto duttile in programmi di miglioramento genetico ma anche come specie modello per gli studi di genetica.

Il pomodoro è una specie importante per la ricerca di base e per quella applicata. Risulta una specie modello per la genetica, in particolare per la quantità di informazioni presenti in letteratura. In particolare, sono state sviluppate molte mappe molecolari ad alta densità le quali, in molti casi, possono essere integrate a mappe costruite *ad hoc* con incroci specifici e sono stati sviluppati database di EST (Expressed Sequence Tag), di BAC (Bacterial Artificial Chromosome) e "full lenght" cDNA. Da due anni è iniziato il progetto di sequenziamento del genoma di pomodoro nell'ambito del progetto SOL (Solanaceae Genome Project) che porterà all'annotazione del genoma di pomodoro (<http://www.sgn.cornell.edu>).

Il miglioramento genetico del pomodoro ha prodotto buoni risultati anche grazie alle caratteristiche di questa specie. *S. lycopersicum* è una pianta autogama e si producono molto facilmente linee inbred. Queste linee, che in altre specie possono essere prodotte solo attraverso coltura di aploidi, in pomodoro sono prodotte tramite ripetuti cicli di auto-impollinazione. Alla fine del processo si ottengono piante omozigoti per il loci di interesse. L'incrocio di due linee inbred porta alla produzione di piante F<sub>1</sub> tutte uguali e in molti casi vigore ibrido. Il pomodoro produce una discreta quantità di semi, di media grandezza, che non hanno bisogno di periodi di vernalizzazione e in serra si possono ottenere circa 3 generazioni in un anno.

Le specie selvatiche di pomodoro sono una notevole fonte di geni utili per il miglioramento genetico e gli incroci tra specie dello stesso "complex" sono molto facili da ottenere. I protocolli tradizionali per il miglioramento genetico sono basati sulla selezione fenotipica e quindi sull'analisi della progenie per verificare la presenza del carattere desiderato. Queste metodiche richiedono tempi lunghi e non sempre si ottengono i risultati desiderati. I tempi sono particolarmente lunghi quando si incrocia una specie selvatica con la specie coltivata. Una tecnica alternativa è stata sviluppata utilizzando i marcatori molecolari associati ai fenotipi di interesse.

La MAS (Selezione Assistita da Marcatori) è una tecnica che prevede l'applicazione di marcatori molecolari alla selezione di piante con il fenotipo desiderato in fase precoce di sviluppo. Questo vantaggio si esplicita in una riduzione della manodopera e di spazi da utilizzare (vantaggi economici). La MAS è condotta tramite l'utilizzo di marcatori molecolari strettamente associati al fenotipo. Possiamo distinguere due categorie di marcatori: marcatori morfologici e marcatori genetici. I marcatori fenotipici sono marcatori che hanno



bisogno come unico mezzo di identificazione i sensi dell'operatore. L'uso di marcatori morfologici è ostacolato da fenomeni di epistasia, dominanza o effetti pleotropici. I marcatori molecolari, invece, sono delle piccole sequenze di DNA che mostrano polimorfismo tra gli individui o tra le specie. I marcatori molecolari hanno numerosi vantaggi rispetto ai marcatori fenotipici: la possibilità di identificare un fenotipo in uno stadio precoce della pianta, una maggiore sensibilità, non sono influenzati dall'ambiente, sono un numero illimitato.

I marcatori molecolari sono divisi in marcatori co-dominanti e marcatori dominanti. I marcatori co-dominanti sono marcatori che, a differenza dei marcatori dominanti, non distinguono un individuo eterozigote da un omozigote. I marcatori co-dominanti sono i marcatori AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms), i marcatori RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) e RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA). Anche se con lo svantaggio della dominanza, questi marcatori sono comunque utilizzati (in particolare gli AFLP) per la riproducibilità e per il potere di studiare un intero genoma. Nel gruppo dei marcatori co-dominanti ci sono i CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence), SCAR (Sequence Characterized Amplified Region), SSR (Simple Sequence Repeat), SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) e dCAPS (Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences). Lo svantaggio è sicuramente che questi marcatori non sono in grado di discriminare un intero genoma ma solo un locus di interesse.

Per identificare marcatori strettamente associati comunemente sono utilizzate popolazioni  $F_2$  o  $BC_1$ . Queste due popolazioni sono state usate per il mappaggio, e quindi per determinare l'associazione con marcatori, di caratteri utili legati alla resistenza a stress biotici (Bai *et al.*, 2003; Chaerani *et al.*, 2006, Foolad *et al.*, 2002; Maliepaard *et al.*, 1995; van Heusden *et al.*, 1999) che in stress abiotici (Foolad *et al.*, 2003; Monforte *et al.*, 1997; Saranga *et al.*, 1993). L'utilizzo della popolazione  $F_2$  per la costruzione di mappe è molto utile e diffuso per determinare effetti dominanti o additivi dei singoli loci ma, il più delle volte, non effetti epistatici. L'utilizzo di  $F_2$  comporta una serie di vantaggi e svantaggi. Il vantaggio maggiore sta nel poter analizzare tutto il genoma selvatico che deriva da un incrocio. Infatti, in una  $F_2$  la quantità di genoma selvatico è il 50% del totale, ovvero tutto il corredo aploide del parentale selvatico. D'altra parte in molti casi i fenotipi delle piante  $F_2$  sono molto differenti e possono compromettere le analisi. Questo accade in particolare quando si incrociano specie relativamente lontane. Utilizzando popolazioni BC si va incontro ad una riduzione del genoma selvatico e quindi di potrebbe ovviare al problema dei fenotipi diversi che influenzano le analisi. Infatti, aumentando i cicli di BC si restaura il fenotipo normale nell'ordine del 50% per ogni incrocio con il parentale ricorrente. Lo svantaggio maggiore è che non si possono fare analisi direttamente su piante derivante da BC dato che si potrebbero perdere informazioni legate al genoma selvatico e non ritrovare il fenotipo di interesse. L'utilizzo di popolazioni avanzate, in associazione con  $F_2$ , può comunque portare a risultati soddisfacenti. Errori nella scelta della popolazione da usare per le analisi può portare a errori nel determinare il locus associato al fenotipo. D'altra parte anche il numero degli individui all'interno della popolazione è fondamentale, in particolare per individuare QTL a "minor effect". Infatti, è stato provato che per determinare un QTL con un effetto sul fenotipo del 5%, occorre una popolazione di circa 200 individui. In alcuni casi non è facile avere una popolazione di queste dimensioni perché si hanno problemi di fertilità incrociando specie filogeneticamente lontane (van Ooijen, 1992).

Un problema, molte volte sottovalutato, nell'associazione di un marcatore ad un fenotipo è la presenza di geni epistatici. L'importanza dei geni epistatici è notevole dato che l'epistasia complica le relazioni tra genotipo e fenotipo (Malmberg *et al.*, 2005). Recenti studi in *Arabidopsis* (Malmberg *et al.*, 2005) e riso (Mei *et al.*, 2000) suggeriscono che gli effetti dei QTL epistatici sono molto più importanti degli effetti dei QTL additivi sulle

capacità adattative degli individui. Al contrario studi effettuati per studiare le interazioni di epistasia in mais hanno condotto alla conclusione che l'epistasia ha una piccola o modesta importanza per i caratteri quantitativi (Schon *et al.*, 2004; Blanc *et al.*, 2006; Mihaljevic *et al.*, 2005). Questi dati contrastanti possono essere dovuti all'importanza che il fenomeno dell'epistasia ha sulle piante che vanno incontro ad "inbreeding" o a "out-crossing", e in parte ad altri fenomeni genetici.

Individuare interazioni tra QTL e geni o locus epistatici è molto difficile. Infatti, generalmente, il numero delle doppie interazioni tra marcatori possibili è molto maggiore rispetto alla grandezza delle popolazioni in esame. Questo significa che molte volte non ci sono abbastanza individui, nella popolazione con i due loci interessanti, per avere una quantità di piante sufficiente per le analisi statistiche. Un altro problema è che molte volte gli effetti di un gene epistatico non sono evidenziati in una popolazione  $F_2$  perché di solito hanno "minor effect".

### Il processo di resistenza a stress biotici

Le piante sono sempre a stretto contatto con migliaia di micro-organismi e la capacità di percepirli e di evitare, o contrastare l'attacco, è una prerogativa importante. Il processo di resistenza è stato classificato nei più svariati modi possibili. La classificazione più usata divide il fenomeno della resistenza in resistenza orizzontale e resistenza verticale. Recenti studi hanno portato, però, ad una nuova classificazione nella quale si distinguono resistenza passiva o attiva. Il meccanismo della resistenza passiva prevede l'accumulo di sostanze tossiche o di barriere fisiche che impediscono ai patogeni di attaccare la pianta. Alcuni esempi sono i glucosinolati prodotti in *Brassica* che sono tossici per gli insetti (Giamoustaris & Mithen, 1995) o gli alcaloidi prodotti nelle specie selvatiche di patata. Tutti questi composti sono costitutivamente espressi e non dipendono dalla presenza del patogeno. La resistenza attiva prevede la produzione di specifiche proteine dopo l'interazione del patogeno con la pianta. Alcuni esempi sono le fitoalessine, come la faseolina espressa in fagiolo, la tomatina in pomodoro e le proteine "Pathogenesis related" (proteine PR). I processi di resistenza attiva si trasferiscono dal punto di attacco a tutta la pianta e portano alla resistenza indotta o sistemica acquisita. Volendo fare una classificazione ancora più precisa dei fenomeni di resistenza questi possono essere divisi in resistenza non ospite e in resistenza ospite. La resistenza non ospite è la resistenza che consente alla pianta di essere resistente alla maggior parte dei patogeni in natura. Questo tipo di resistenza può essere identificata come resistenza orizzontale-passiva. Infatti, le piante non hanno bisogno di particolari geni per la manifestazione della resistenza dato che hanno le difese costitutivamente espresse. Solo in alcuni casi si può notare la formazione di papille in corrispondenza l'appressorio. Nell'ambito della resistenza ospite possiamo distinguere due sotto gruppi: la resistenza mediata da ipersensibilità (HR) e la resistenza parziale. La HR è la più comune dei fenomeni di resistenza. Questa consiste nella necrosi delle cellule intorno al punto di penetrazione ed è considerata una difesa attiva e associata alla resistenza verticale. I geni di resistenza funzionano secondo la teoria "gene-per-gene" (Flor, 1971) che prevede un gene *R* detto recettore e un gene *Avr* detto effettore. I geni *R* sono classificati in cinque categorie, divise in base ai motivi funzionali. Alla prima classe appartengono i geni simili alla serina\treonina proteina chinasi, come *Pto*. Alla seconda, e più numerosa classe appartengono i geni che mostrano (dall'esterno della cellula verso l'interno) un dominio LRR (Leucine Rich-Repeats), un motivo NBS (Nucleotide Binding Site) e un dominio LZ (Laucine-zipper) o CC (Coiled-Coil). La terza classe è costituita da geni molto simili ai precedenti ma con un dominio di tipo TIR (Toll and Interleukin 1 receptor) nella parte citoplasmatica. Il gruppo quattro è formato da geni che mancano del dominio citoplasmatico come i geni *Cf* di

resistenza a *Cladosporium fulvum*. La quinta classe è formata dal gene *Xa21* che ha un dominio citoplasmatico serina/treonina proteina chinasi e un dominio extracellulare tipico della classe due. La classe numero sei è rappresentata dai geni di resistenza che non possono essere classificati nei precedenti gruppi. La HR è la più tipica forma di resistenza associata ai geni di resistenza che funzionano secondo il modello “gene-per-gene” (*R*-gene). La HR tipicamente porta alla formazione di proteine PR e fitoalessine o altri composti fungicidi e/o battericidi.

La resistenza parziale è una resistenza incompleta. Infatti, in questa interazione il patogeno può superare le barriere della pianta ospite, ma non si hanno gravi sintomi come accade nella interazione di suscettibilità. Anche in questo caso si hanno necrosi e clorosi che sono prodotte dopo l'attacco. In aggiunta si ha una minore riproduzione del patogeno sulla pianta ospite rispetto alla pianta completamente suscettibile.

Un recente lavoro di Crisholm e associati (2006) descrive a livello molecolare, la reazione di resistenza dividendola in due “strati” (Fig.1). Il primo strato è dato da un set di geni localizzati sulla membrana detti “Pattern Recognition Receptors” (PRR), che hanno la funzione di legarsi agli effettori del patogeno (Pathogen-Associated Molecular Patterns PAMP). Questa resistenza innata è detta difesa scatenata dalle PAMP (PAMP-Triggered Immunity: PTI) (Chisholm *et al.*, 2006). L'interazione PRR-PAMP induce nella cellula uno stato di allerta e fa scatenare cascate del segnale che portano alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), di proteine PR e anche alla deposizione di callosio come barriera alla penetrazione. Nonostante la complessità del fenomeno descritto, alcuni patogeni hanno evoluto sistemi per superare la prima barriera. In questi casi i patogeni producono PRR che non interagiscono con le PAMP della pianta. La pianta, quindi, ha evoluto un altro livello di resistenza che è frutto dell'interazione diretta o indiretta tra un effettore e un gene *R* (Effectors-Triggered Immunity ETI). L'ETI è una forma di difesa specializzata che si evolve in associazione all'interazione pianta patogeno. La ETI segue il modello “gene-per-gene” formulato da Flor (1971). Anche in questo tipo di immunità la pianta “combatte” il patogeno producendo ROS e proteine PR. La PTI e la ETI hanno molte caratteristiche comuni come, l'impiego di un effettore per scatenare la reazione di resistenza; con la ETI si ha, però, una risposta più immediata all'attacco (Tao *et al.*, 2003). La HR, preceduta dalla ETI, si esplicita con una risposta rapida e la morte le cellule attaccate per bloccare lo sviluppo del patogeno. Generalmente l'associazione tra una proteina R e l'effettore del patogeno portano ad una HR, che è la componente centrale delle ETI (Chisholm *et al.*, 2006). Dopo l'innescò della HR, la H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> potrebbe essere la molecola che trasmette il segnale e porta alla morte cellulare (Hückelhoven & Kogel, 1998; Lamb & Dixon, 1997). L'induzione di vari tipi di proteine PR rappresenta uno dei meccanismi basali. Alcune di queste proteine sono specifiche e localizzate in specifici percorsi metabolici attivati da acido salicilico (SA), acido jasmonico (JA) o etilene (ET) (Smart *et al.*, 2003). Oltre alle proteine PR altri geni sono indispensabili per l'attivazione delle risposte di difesa come ad esempio il complesso SGT1 nella risposta mediata da geni *R* e il gene *PEN1* nella risposta esplicitata dalla formazione di papilla nel sistema mlo in orzo (Bai *et al.*, 2006).

Patosistemi:

Muffa polverosa del pomodoro: *Oidium neolycopersici*

*Oidium neolycopersici* è uno degli agenti causali della muffa polverosa del pomodoro. In natura possiamo trovare due tipi di *Oidium* che attaccano il pomodoro: *Oidium neolycopersici* e *O. lycopersici*. La caratteristica che distingue *O. neolycopersici* da *O. lycopersici* è che il primo forma solo un conidio o al massimo una pseudo catena di 2-6 conidi in condizioni di alta umidità relativa, mentre *O. lycopersici* forma, a tutte le

condizioni meteorologiche, catene di conidi indipendentemente. *O. neolycopersici* è polifago ed è capace di attaccare circa 60 specie in circa 13 famiglie differenti. Gli studi condotti su *O. neolycopersici* non hanno chiarito ancora il suo centro di origine. Il primo isolato europeo è stato trovato in Olanda nel 1986, ma rapidamente si è espanso in tutto il mondo (Paternotte, 1988). Vari studi sono in corso per capire come questo patogeno possa essersi espanso così velocemente negli ultimi anni.

La muffa polverosa del pomodoro è un patogeno biotrofico obbligato e quindi ha bisogno di penetrare nell'ospite per continuare l'infezione (Jones *et al.*, 2001). La struttura che è capace di iniziare un attacco è sempre il conidio. Dal conidio si forma una ifa che forma l'appressorio, generalmente nell'intersezione di tre cellule epidermiche. Dall'appressorio si forma la "PEG penetration" che buca la cellula e stabilisce la connessione tra cellula vegetale e patogeno. A questo punto il patogeno produce una serie di ife secondarie che colonizzano la parte vicina al primo punto di infezione. Il ciclo asessuale finisce con la formazione di conidiofori perpendicolari alla superficie della cellula. Il conidioforo ha alla base una serie di conidi immaturi che sostengono l'unico conidio maturo.

La mancanza di ciclo sessuale in questo patogeno rende molto facile lo studio della sua evoluzione. Noordeloos e Loerakker (1989) diedero il nome di *O. lycopersicum* al ceppo europeo della muffa polverosa del pomodoro, che sembra essere stata introdotta dall'Australia. Questo nome fu cambiato in *O. lycopersici* nel 1999, in accordo con il codice internazionale di letteratura botanica (Mieslerová & Lebeda, 1999). Il patogeno che ha causato tutte le più grandi epidemie in Europa e fuori l'Australia in generale è stato di recente rinominato *O. neolycopersici* basandosi su analisi molecolari degli spazi tra le regioni degli rRNA e sulla morfologia del fungo (Kiss *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2000).

Poche moderne cultivar di pomodoro sono resistenti a *O. neolycopersici*. Promettenti fonti di resistenza alla muffa bianca del pomodoro sono disponibili in differenti specie all'interno del genere *Solanum* (Lindhout *et al.*, 1994; Mieslerová *et al.* 2000). La resistenza in *S. hirsutum* G1.1560 e G1.1290 è controllata da due geni dominanti *Ol-1* e *Ol-3*, i quali mappano sul braccio lungo del cromosoma 6 (Huang *et al.*, 2000; Van der Beek *et al.*, 1994). La resistenza in *S. lycopersicon* var *cerasiforme* LA1230 è controllata da un gene recessivo *ol-2* che mappa sul cromosoma 4 (Ciccarese *et al.*, 1998; De Giovanni *et al.*, 2004). Altre fonti di resistenza sono state introgressate in pomodoro da *S. neorickii*. *Ol-qt11*, *Ol-qt12* e *Ol-qt13* sono stati scoperti avere effetto nel processo di resistenza a *O. neolycopersici*. *Ol-qt11* è stato mappato sul braccio corto del cromosoma 6 mentre *Ol-qt12* e *Ol-qt13* sul braccio corto del cromosoma 12 (Bai *et al.*, 2003).

La risposta delle piante all'attacco di *O. neolycopersici* è principalmente di tipo HR o con la formazione di papille. La HR è esplicitata dalla pianta come una morte cellulare localizzata alla zona di attacco del patogeno, mentre la formazione di papille porta alla formazione di un "tappo" di callosio sotto l'appressorio del patogeno (Israel, 1980; Heath, 1981). Studi istologici mostrano che la resistenza a *O. neolycopersici* nelle specie selvatiche di pomodoro è associata prevalentemente alla HR. La formazione di papille è prevalentemente associata alla resistenza pre-austorio, che non è comune nelle specie del genere *Solanum* (Huang *et al.*, 1998; Lebeda *et al.*, 2000).

#### Peronospora del pomodoro e della patata: *Phytophthora infestans*

La peronospora è una delle malattie più importanti che colpisce le Solanaceae. Il maggior attacco di peronospora si è avuto nel 1840 in Irlanda, che ha causato milioni di morti; ancora oggi porta alla perdita di ingenti quantità di patate e pomodori. La peronospora è causata dall'oomicete *Phytophthora infestans*.

Questo oomicete è un fungo polifago appartenente alla famiglia delle Peronosporaceae. Il centro di origine e di diversificazione di questo patogeno è stato localizzato nell'altopiano del Messico dove si è evoluto insieme al germoplasma del genere *Solanum*. I geni *R* di resistenza a peronospora sono stati scoperti in diverse specie di *Solanum*, tra cui *S. bulbocastanum*, *S. demissum*, *S. stoloniferum* e *S. commersonii*. La presenza di geni *R* è il risultato della coevoluzione tra *P. infestans* e le specie di *Solanum*. La peronospora comprende diversi biotipi a parassitismo specializzato capaci di attaccare tutta la famiglia delle Solanaceae. Colpisce indifferentemente piante presenti in pieno campo o in coltura protetta in relazione a particolari condizioni climatiche: umidità stagnante, rugiada intensa, piogge ravvicinate e temperature non molto elevate. I sintomi dell'infezione si manifestano in tutti gli organi della pianta e possono portare, nei casi più gravi, a una perdita del raccolto sia per avvizzimento e disseccamento della pianta sia per distruzione diretta dei frutti. Sulle foglie la malattia si presenta sotto forma di macchie decolorate irregolari, localizzate marginalmente o internamente al lembo, che successivamente imbruniscono assumendo prima un aspetto verde scuro e poi bruno-bronzeo. In condizioni di elevata umidità l'alterazione si estende rapidamente sull'intero lembo fogliare, mentre nella pagina inferiore compare una leggera efflorescenza bianca-rilucente dovuta alla presenza degli zoosporangiofori del fungo. Sui fusticini, sui piccioli fiorali e sui peduncoli fiorali l'infezione si manifesta solo nel caso di forti attacchi, presentando una sintomatologia molto simile a quella riscontrabile nelle foglie. Si evidenziano striature longitudinali più o meno estese, di colore bruno, in corrispondenza delle quali gli organi si piegano o si spezzano. L'attacco sui frutti interessa generalmente le bacche ancora verdi e si manifesta inizialmente con la presenza di aree edematose e irregolari che successivamente si disidratano e divengono repressi. Contemporaneamente i tessuti interni si raggrinziscono, imbruniscono e assumono una consistenza stopposa. Solo in condizioni di elevata umidità dell'aria si può riscontrare sulla parte colpita del frutto la presenza di una muffa biancastra. La bacca, una volta colpita, interrompe la maturazione, si distacca dalla pianta e successivamente marcisce.

Durante il periodo invernale il patogeno sverna sui residui vegetali sotto forma di micelio, per poi riprendere la sua attività infettiva durante il periodo primaverile (Fig.1). L'emergenza degli sporangiofori si ha quando l'umidità dell'aria supera l'85% e la temperatura ottimale è di 22°C, mentre per la formazione degli sporangi è necessario un tasso di umidità superiore al 90% e una temperatura tra 18°C e 24°C. Gli sporangi successivamente sono trasportati attraverso l'acqua e il vento sugli organi della pianta dove, in base alla temperatura, germinano direttamente per micelio (18°C) o indirettamente per liberazione di zoospore mobili. L'incubazione varia tra 60 e 144 ore a seconda della temperatura, tipo o varietà di ospite. I periodi più brevi si hanno intorno a 20°C - 23°C, che corrispondono all'optimum per l'accrescimento del micelio (Fig.1). La peronospora del pomodoro ha anche un ciclo sessuale. Per far sì che questo avvenga, si devono incontrare i ceppi A e B compatibili. In quella situazione uno sporangio diventa oogonio e l'altro anteridio. L'oogonio attraversa l'anteridio e dà inizio alla fase sessuale. I due genomi si rimescolano con la formazione della oospora, con un genoma differente dai parentali, che successivamente libera le zoospore. La lotta contro la peronospora del pomodoro avviene attraverso l'utilizzo di anticrittogamici che devono essere somministrati tempestivamente, non appena si verificano le condizioni termo-igrometriche favorevoli per lo sviluppo del patogeno.

Il primo gene di resistenza a *P. infestans* ad essere stato isolato nelle *Solanaceae* è stato *R1*. Il prodotto genico conferisce resistenza specifica ad isolati di *P. infestans* razza 1 (Ballvora *et al.*, 2002; Ercolano *et al.*, 2004). Il gene è stato isolato da linee di introgressione di *Solanum demissum* utilizzando una tecnica chiamata "chromosome walking" ad alta risoluzione di parte del cromosoma V. Il gene è stato poi trasferito in

varietà di patata coltivata (Dèsirée) mediante trasformazione genetica, conferendo resistenza al patotipo di interesse. La sequenza amminoacidica, codificata dal gene, produce una proteina che è classificata nel secondo gruppo di geni di resistenza. La proteina, infatti, possiede un motivo LZ, una regione LRR e un dominio NBS. La sequenza amminoacidica della proteina ha una elevata similarità con il prodotto genico *Prf*. In particolare, la similarità è molto alta nelle sequenze dei domini funzionali. È stato osservato che il gene *R1* è localizzato in una regione del cromosoma V nella quale sono presenti altri geni di resistenza.

Recentemente è stato isolato un altro gene chiamato, *RB* da *Solanum bulbocastanum*, specie selvatica diploide di origine messicana (Song *et al.*, 2003). L'isolamento di questo gene in patata ha una notevole importanza perché conferisce resistenza al ceppo di *P. infestans* (126C18), che ha superato tutti i geni di resistenza fino ad ora isolati da linee selvatiche. L'analisi della sequenza amminoacidica del prodotto genico ha evidenziato un elevato grado di omologia di sequenza tra questo e *R1* (circa il 49%, 902 aa). Anche questo gene è classificato nel secondo gruppo di geni di resistenza (Song *et al.*, 2003).

Sullo stesso cromosoma è stato trovato un cluster di geni con una omologia molto alta con il gene *RB*. In particolare, sono stati trovati 4 geni molto associati e molto simili. Tra questi il gene *Rp1-blb2* conferisce resistenza a 10 isolati di *P. infestans* più aggressivi, compresi il patotipi A e B che danno origine al ciclo sessuato, particolarmente aggressivi su cultivar di MoneyMaker. Anche questo gene appartiene alla seconda classe di geni di resistenza dove è presente anche il gene *R1* ed ha in comune con questo tutti i domini tipici di questa classe di geni (CC-NBS-LRR) (van der Vossen *et al.*, 2003). Il gene *R3a* è ancora il frutto del lavoro indirizzato all'isolamento di geni di resistenza alla peronospora. Il gene *R3a*, isolato da Huang *et al.* (2005), conferisce resistenza alla razza 3 di *P. infestans*.

Anche lo studio dei geni coinvolti nel processo di resistenza a *P. infestans* sono stati studiati per migliorare le conoscenze del processo. Birch *et al.* (1999), tramite SSH, ha condotto una analisi molecolare per individuare geni differenzialmente espressi durante le prime fasi dell'interazione patata-peronospora, identificando circa 36 cloni differenzialmente espressi durante la reazione di resistenza.

#### Identificazione di geni coinvolti nel processo di resistenza

Nella reazione di resistenzasi possono distinguere i geni *R* che funzionano come sensori per gli effettori del patogeno, e i geni che trasducono il segnale per attivare il processo di resistenza. Lo studio di questi due grandi gruppi di geni suscita notevole interesse nel mondo scientifico.

Nel caso dei geni di resistenza, le metodiche più utilizzare al fine del clonaggio, sono state il "positional cloning", l'omologia genica e il "chromosome tagging". Queste tecniche sono entrambe valide, anche se il "positional cloning" è stato utilizzato con maggiore successo. Il "positional cloning" prevede la produzione di una mappa di associazione tra la specie senza il carattere di interesse e la specie che lo porta. La produzione di una mappa satura di marcatori porta all'associazione di un marcatore nelle vicinanze del gene che conferisce il carattere in esame. L'analisi di una libreria BAC è l'atto ultimo per l'identificazione del gene di interesse. La mappa così prodotta può essere utilizzata in analisi di associazione per identificare e localizzare QTL. Un esempio è dato dall'interazione muffa polverosa-pomodoro. Infatti, la resistenza ad *O. neolycopersici* può essere di tipo qualitativo (quindi determinata da un unico gene) o di tipo quantitativo, controllata da un Quantitative Resistance Loci (QRL). Nel caso dei geni di resistenza che funzionano secondo la teoria "gene-per-gene" l'associazione di un marcatore risulta molto più semplice rispetto ad un gene ad effetto quantitativo. Infatti, nel caso di un gene di resistenza basta applicare la relazione  $[1 - (1 / 4)^n] \times (1 / 4)^m$  (n rappresenta la dimensione del pool-resistente e m la

dimensione del pool-suscettibile) in due pool che sono formati dallo stesso numero di individui per determinare se il marcatore individuato è effettivamente associato al fenotipo o è frutto della casualità (Michelmore *et al.*, 1991). La relazione indica la probabilità che il marcatore non sia associato al fenotipo. Il concetto e i programmi richiesti per il mappaggio dei QTL sono stati trattati da Collana *et al.* (2005). Nel caso di QTL un problema molto importante per la sua identificazione è l'interazione con l'ambiente.

Il secondo gruppo di geni è coinvolti nel processo di trasduzione del segnale, dopo l'interazione effetore-recettore. Questi geni sono molto più numerosi, ma in molti casi comune a più patosistemi. Infatti, nel caso del fenomeno della resistenza, è stato verificato che patosistemi diversi attivano la stessa via di risposta attraverso geni comuni. Gli studi condotti tramite espressione differenziale utilizzando tecniche come i microarray, cDNA-AFLP e SSH hanno permesso di identificare e isolare i geni che fanno parte del processo di trasduzione del segnale. Le tre tecniche citate hanno una serie di vantaggi e svantaggi. Tutte hanno la capacità di analizzare l'intero trascrittoma della pianta, ma solo con i microarray e la SSH è possibile individuare in modo più preciso frammenti trascritti differenzialmente. In particolare, la SSH ha la capacità di individuare frammenti rari all'interno del trascrittoma. Questa tecnica consente di arricchire fino a 1000 volte un frammento di trascritto. Il maggior svantaggio della tecnica è la presenza di background derivanti da cDNA non differenzialmente espressi (ridondanti) nella libreria finale (Rebrikov *et al.*, 2000).

Per questi motivi la SSH è una tecnica efficiente e ampiamente usata per l'identificazione di geni differenzialmente espressi. La chiave della SSH è la simultanea sottrazione e normalizzazione che porta tutti i trascritti ad essere abbondanti allo stesso modo nella popolazione sottratta. La SSH è una tecnica sviluppata nel 1996 da Diatchenko *et al.* Esperimenti che utilizzano questa tecnica sono stati condotti per determinare geni differenzialmente espressi in vari tessuti, per isolare geni espressi dopo uno stress biotico o abiotico (Ouyang *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2007; Keinanen *et al.*, 2006). La tecnica prevede l'utilizzo di due popolazioni di cDNA, a doppio filamento, prodotto dal RNA dei due differenti sistemi da studiare. La tecnica permette di studiare un determinato fenotipo (T1) rispetto ad un fenotipo di riferimento (T0). Il cDNA del sistema T1 è sottratto e prende il nome di "tester", mentre il cDNA T0 è sottratto e chiamato "driver". Dopo la sottrazione di queste due popolazioni di cDNA, il risultato sarà costituito da cDNA che sono espressi unicamente nel campione "tester" (nell'esempio la pianta T1 dopo essere stata inoculata). Successivi cicli di PCR portano all'arricchimento dei frammenti meno espressi. I frammenti prodotti, clonati in un vettore, portano alla produzione di una libreria SSH con EST specifiche espresse solo nello stadio di interesse.

#### Scopo della tesi

Il lavoro della presente tesi si inserisce in progetti di ricerca già avviati da molti anni presso il dipartimento di scienze del suolo della piante dell'ambiente e delle produzioni animali. Lo studio dell'interazione pianta-patogeno riveste un ruolo chiave nella produzione di cultivar di piante resistenti a patogeni agronomicamente importanti come sono la *P. infestans* e l'*O. neolycopersici*. Negli anni passati notevoli progressi sono stati fatti nella produzione di piante resistenti a questi due patogeni ma attualmente non esistono varietà commerciali resistenti. Il lavoro della presente tesi ha come obiettivo lo studio della resistenza a *P. infestans* e a *O. neolycopersici* tramite l'utilizzo di piante completamente resistenti al fine di ottenere informazioni utili per la produzione commerciale di piante resistenti. La resistenza totale alla peronospora è stata conferita tramite trasformazione genetica di pomodoro con il gene di resistenza R1. Questo gene, purtroppo, è un gene di resistenza che non funziona con le nuove razze del patogeno e quindi non è capace di conferire resistenza ad ampio spettro. Lo studio dell'interazione, comunque, è indirizzato all'isolamento di geni che sono coinvolti nel processo di resistenza alla razza 1 del

patogeno. In particolare si cercherà di identificare geni chiave nel pathway di trasduzione del segnale o a monte della risposta ipersensibile. L'importanza di questi geni è dovuta all'evidenza, che in molti casi l'overespressione di questi geni, in assenza del patogeno, conferiscono un ampio spettro di resistenza a differenti isolati di peronospora anche se isolati da patosistemi specifici. In questo modo si potrebbe ipotizzare l'ingegnerizzazione di piante di pomodoro con uno di questi geni e rendere queste piante costitutivamente resistenti al patogeno. Inoltre questo tipo di resistenza potrebbe essere anche difficilmente superabile.

La resistenza ad *O. neolycopersici* sarà studiata tramite l'utilizzo di una resistenza poligenica identificata nella specie selvatica di pomodoro *S. neorickii*. Tale resistenza è conferita tramite tre differenti QTL, due dei quali localizzati sul cromosoma 12 di pomodoro. Lo studio dei QTL è di notevole interesse scientifico date le scarse informazioni che si hanno sul modo di azione dei QTL. In molti casi è molto difficile sfruttare resistenze di tipo quantitativo dato che la resistenza non si esplicita in tutti gli ambienti. Infatti è noto che i QTL sono influenzati da fattori esterni. I QTL sono associati a regioni molto ampie nelle quali, in molti casi, sono localizzati geni non desiderati al fine del miglioramento genetico. Una migliore comprensione dell'azione dei QTL potrebbe portare ad una migliore utilizzazione dei QTL fino ad oggi determinati. Inoltre è stato determinato un gene epistatico. I geni epistatici sono dei geni con una funzione ancora più ignota dei QTL. Questi geni, infatti, hanno la capacità di mascherare o variare gli effetti di un altro gene. Lo studio dei geni epistatici, proprio per gli effetti che danno, è di notevole attualità. Inoltre questi geni in molti casi compaiono i programmi di miglioramento genetico della piante coltivate. L'utilizzo di un gene di resistenza e non identificare un putativo gene accessorio potrebbe portare allo spreco di materiale e soldi durante i programmi di miglioramento.

## Materiali e metodi

### *Oidium neolycopersici*-pomodoro

#### Materiale vegetale

Le popolazioni utilizzate nel lavoro di interazione *Oidium neolycopersici*-pomodoro sono state derivate dall'incrocio tra il parentale suscettibile *S. lycopersicum* cv MoneyMaker (ricorrente) e il parentale resistente *S. neorickii* G1.1601. In datteggio sono state analizzate 1 popolazione F<sub>2</sub>, 1 popolazione BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> (PopA), 3 popolazioni BC<sub>2</sub>S<sub>2</sub>, derivate dall'autoimpollinazione di singoli individui della BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> e 1 BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub>. Le popolazioni sono state prodotte seguendo lo schema in figura 3. La popolazione F<sub>2</sub> è il risultato del "selfing" della popolazione F<sub>1</sub>. La popolazione A è stata prodotta tramite l'autoincrocio di un singolo individuo BC<sub>2</sub>. Al fine di ottenere popolazioni resistenti al patogeno *Oidium neolycopersici* le piante utilizzate per i successivi backcross sono state scelte tramite selezione assistita utilizzando i marcatori CT129 e TG111 per determinare gli individui con i loci resistenti all'Ol-qt1 sul cromosoma 12. Le piante della popolazione BC<sub>1</sub>, in aggiunta all'analisi molecolare per determinare la presenza del locus resistente, sono state saggiate con test di resistenza al fine di avere una selezione sicura per gli individui da portare avanti.

L'analisi AFLP è stato condotto utilizzando i due parentali, due pre-NIL (Li et al. 2005) con differenti D.I. e due pool di DNA. I due pool sono stati formati utilizzando individui con l'allele resistente locus Ol-qt12 ma con differenti D.I. Il pool resistente contiene DNA derivato da 9 individui resistenti mentre il pool suscettibili contiene 8 individui suscettibili tutti derivanti dalla BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>. I pool sono formati da DNA dopo la preamplificazione nella procedura AFLP.



### Estrazione el DNA

Il DNA utilizzato è stato estratto da foglioline di circa tre settimane di pomodoro con il protocollo "Retch 1.3". Il materiale vegetale fresco è stato macinato con due palline di acciaio, in combinazione con la soluzione CTAB di estrazione (100ml 1M TRIS pH 7.5, 140ml 5M NaCl, 20ml 0.5M EDTA pH 8.0, 740ml MilliQ H<sub>2</sub>O e 2% CTAB disciolto a 65°C in un a bagnomaria) ed Rnase (1µl per 1ml di CTAB) nelle pastre Costar da 96 (Corning Inc., Corning, NY, USA) usando la macchina per macinare i campioni in Retch. Le foglie macinate sono state incubate a 65°C per un'ora. Alla soluzione è stato aggiunto un ugual volume di cloroformio:alcool isoamilico (24:1) e misciati per 5 min. La mistura è stata centrifugata a 3500rpm per 15 min e il surnatante è stato trasferito in un nuovo tubo. Al surnatante è stato aggiunto un volume di isopropanolo e centrifugato per 10 min a 3500. Il precipitato è stato asciugato e poi risospeso in acqua milliQ.

### Materiale fungini

Il fungo, *O. neolycopersici*, è stato isolato da linee di pomodoro commerciale in Olanda (Lindhout et al., 1994a). l'isolato è mantenuto è propagato su piatte suscettibili di pomodoro Monaymaker in una camera climatica a 20°C con una umidità del 70% con 16 ore di luce artificiale. L'inoculo è preparato tramite lavaggio dei conidi dalle foglie di pomodoro con acqua corrente. La concentrazione della sospensione è portata a  $2 \times 10^4$  conidi /ml usando un hemocitometro.

### Set up esperimento

Al fine del mappaggio fine dei QTL con le linee ricombinanti, 60 semi autofecondati per ciascuna linea recombinante sono stati seminati per ottenere almeno 40 piante adulte (chiamate famiglie RF). Trenta semi per ogni parentale sono state seminate ma solo 20 piante sono state utilizzate negli esperimenti. Due settimane dopo la semina, le piantine sono state trapiantate nei vasetti e trasferite in un comparto PK2 dell'Unifarm a Wageningen con 19-21 °C, 60% di umidità relativa e 16 ore di luce per giorno. L'inoculo è stato spruzzato tramite spray due settimane dopo il trapianto con inoculo fresco. La valutazione della malattia tramite "disease index" (D.I.) è stato valutato dopo 12, 17 e 20 giorni dall'inoculo. Il D.I. è stato valutato in un intervallo tra 0 e 3 (D.I.= 0 nessuna sporulazione del fungo, D.I.=1 poca sporulazione, D.I.=2 moderata sporulazione, D.I.=3 abbondante sporulazione. Per una maggiore accuratezza anche i decimali sono stati introdotti) (Fig.4).

### 2.2.6 Map Calculation, QTL Detection and Data Analysis

La mappa genetica è stata costruita tramite il software JoinMap® 3.0 (Van Ooijen and Voorrips, 2001). Le distanze indicate sulle ampie di linkage sono state calcolate tramite l'algoritmo Kosambi. La segregazione degli alleli, al fine di utilizzare dei dati corretti, è stata testata utilizzando il test del chi-quadrato. I QTL sono stati mappati tramite il programma MapQTL®5. Un test di permutazione ha determinato il limite soglia al di sotto del quale il QTL poteva essere non statisticamente significativo. Il valore soglia è di 3 per la funzione "interval map" (IM) e "multiple QTL models" (MQM) utilizzate per l'analisi (Van Ooijen, 2004). La media dei dati fenotipici (D.I.) delle tre verifiche a 11, 14 e 17 giorni dopo l'inoculo per la popolazione A sono state utilizzate per l'analisi dei QTL. SPSS13 è stato usato per l'analisi ANOVA per determinare l'effetto del genotipo sul fenotipo nelle

popolazioni BC2S2 utilizzate e i test LSD e Tukey per determinare le differenze tra le stesse popolazioni.

#### Analisi AFLP

AFLP è stato condotto come descritto da Vos et al (1995). La restrizione e ligazione è stata condotta con le coppie di enzimi EcoRI\MseI e PstI\MseI. I primer sono stati marcati con due differenti fluorocromi che emettono a IR700 o IR800. I gel AFLP, con una percentuale di acrilammide del 6%, sono stati analizzati tramite LI-COR 4200, 4300 e "IR2 DNA analyzers".

#### Phytophthora infestans-pomodoro

##### Materiale vegetale

Le piante di pomodoro utilizzate per gli esperimenti di interazione con *Phytophthora infestans* sono state ottenute dall'autoimpollinazione di un trasformato primario (T0) per il gene R1 resistente a peronospora. Le piante T1 sono state sagiate tramite PCR utilizzando primer specifici per il gene R1. Le piante omozigoti o eterozigoti sono state sagiate con test di patogenicità a *P. infestans* razza 1.

##### Materiale fungino

Due differenti ceppi di *P. infestans* sono stati coltivati su terreno V8 (200 ml V8, 3 g CaCO<sub>3</sub>, 800 ml di acqua distillata, 15 g agar, pH 6.4) per 10 giorni fino alla copertura totale della piastra. I ceppi utilizzati sono il ceppo 88133=Ph 1000 che identifica un patotipo A2 e porta i geni di avirulenza 1,3,5,7,11 (razza 1) e il ceppo IPO=Ph 1003 che identifica il patotipo A1 e non ha nessun gene di avirulenza (razza 0). Sono stati effettuati due tipi di test di resistenza. Il primo per una valutazione della resistenza di tipo qualitativa tramite discetto di agar che prevede l'applicazione di un discetto di micelio sulla foglia di pomodoro. Il secondo test è stato condotto tramite l'utilizzazione delle zoospore di *P. infestans*. La cultura su mezzo solido è stata spatolata con acqua e le oospore disciolte. La soluzione di acqua e oospore è stata incubata in frigo (4 °C) per 4-5 ore al fine di fare liberare le zoospore. Le zoospore sono state stimate tramite contaglobuli e quindi portate alla stessa concentrazione per entrambi i ceppi. Una goccia di tale soluzione (20 µl) è stata applicata sulle foglie di pomodoro. I campioni sono stati prelevati a 0,5-3-6 ore dopo l'inoculo e congelati in azoto liquido.

##### Disegno di primer

Le combinazioni di primer per i marcatori RFLP, COS (conserved ortholog sequences) e COSII ma anche sequenze di cloni BAC e Unigene sono state disegnate da sequenze contenute nel sito web Solanum Genomics Network (SGN, <http://www.sgn.cornell.edu/index.pl>). I primer sono stati disegnati con l'ausilio del software Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000; <http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3-www.cgi>). Inoltre anche primer locus specifici sono stati disegnati utilizzando dati presenti in letteratura. Le ipotetiche sequenze amminoacidiche dei geni del cluster del gene *Gpa2* sono state utilizzate al fine costruire primer degenerati da applicare alla popolazione. I marcatori molecolari CT129 e TG111 sono stati costruiti usando informazioni derivanti da mappe genetiche di altre specie del genere *Solanum* per individuare regioni sintoniche al cromosoma 12. I marcatori CAPS sono stati generati come descritto da Bai et al (2003). I primer utilizzati per le Real Time PCR sono stati disegnati utilizzando le sequenze derivanti dai singoli cloni della libreria sottrattiva con l'ausilio del programma Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000; <http://frodo.wi.mit.edu/cgi->

[bin/primer3/primer3 www.cgi](#)). Per i primer dei geni *PAL*, *Pr1* e *Ef1* sono state utilizzate sequenze specifiche per i geni di interesse isolati nella specie *S. lycopersicum*. Le caratteristiche delle coppie di primer hanno soddisfatto specifici parametri tra cui la lunghezza del frammento amplificato che ha variato tra gli 80 e 150 bp, una temperatura di attacco di 60°C, una percentuale di GC superiore al 45%, una lunghezza di 20-25 nucleotidi e la massima riduzione di complementarità tra i due primer.

#### Amplificazione del DNA mediante "Polymerase Chain Reaction" (PCR)

Le reazioni PCR sono state condotte utilizzando Taq DNA Polymerase Kit (Invitrogen) e circa 50 ng di DNA genomico in un termocicizzatore Biometra ed utilizzando cicli termici adattati alle singole combinazioni primer/sequenza (Tab. 5).

La miscela, per le reazioni di amplificazione, è stata preparata utilizzando 1 U di Taq, 10 pM di Primer Forward e 10 pM di Primer Reverse, 10 pM di dNTP e 1X di Buffer in un totale di 10µl di reazione. Le amplificazioni sono state effettuate tenendo presente che l'enzima Taq polimerase è capace di elongare 1000 Kb per minuto. Inoltre le temperature di annealing sono riportate in tabella .

#### Reazioni di digestione.

Le reazioni di digestione con gli enzimi di restrizione sono state condotte utilizzando 5µl di amplificato, 1 U di enzima, 1 X di buffer in un volume finale di 20µl. Le reazioni sono state condotte over-night in fornetti a temperatura controllata. La temperatura di reazione è stata variata a seconda dell'enzima utilizzato in base alle specifiche datate dalla ditta produttrice.

#### Gel di agarosio

I frammenti derivanti da reazioni PCR, di digestione e di retrotrascrizione sono stati separati mediante elettroforesi in gel di agarosio all'0,8-2% in TBE (10 mM Tris-Cl pH 7.8, 5 mM Acetato di Sodio, 0.5 mM EDTA, pH 7.8 con Acido Borico). Al gel di agarosio liquido sono stati aggiunti 0,03 µl/ml di Bromuro di Etidio. Ai campioni è stato aggiunto 1X di colorante (4M Urea, 50% Saccarosio, 50 mM EDTA pH 8.0, 0.1% Bromofenolo Blu). La percentuale dell'agarosio è variata in base alla grandezza dei frammenti in esame.

#### Estrazione dell'RNA e produzione di cDNA

L'RNA è stato estratto da tessuto fogliare fresco. 0,1 grammi di tessuto fogliare è stato macinato in azoto liquido ed estratto con l'RNeasy plant mini kit (QIAGEN). L'RNA è stato quantizzato tramite "Nanodrop". Per la produzione del cDNA è stato utilizzato la SuperScript III (Invitrogen). Al fine di ottenere una popolazione di cDNA totale è stato utilizzato un oligodT<sub>20</sub> con circa 4µg di RNA totale.

#### Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT - PCR)

La "Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction" (RT-PCR) è stata condotta utilizzando su cDNA prodotto come descritto nel paragrafo precedente. Le reazioni di RT-PCR sono state condotte come normali reazioni PCR utilizzando circa 500ng di cDNA. Per le reazioni Real Time PCR i campioni di cDNA sono stati diluiti circa 1/50 rispetto alle normali reazioni di RT-PCR. La miscela di reazione è stata ottenuta utilizzando 1µl della soluzione diluita 1/50, 1X di "master mix" e 3mM di primer reverse e di primer forward. Le reazioni di real time PCR sono state condotte utilizzando un ciclo tri-step e una temperatura di attacco di 60°C. Inoltre la specificità dei primer è stata testata tramite la produzione della curva di dissociazione.

#### Produzione della libreria

La libreria sottrattiva è stata prodotta utilizzando il [“PCR-Select Differential Screening Kit”](#) prodotto dalla Clontech (Diatchenko *et al.*, 1996). I frammenti prodotti dopo la sottrazione sono stati clonati in pCR2.1 utilizzando il “TA easy vector” (Invitrogen). I frammenti clonati sono stati trasformati in DH5 $\alpha$  ad alta efficienza di trasformazione (Invitrogen). Le colonie trasformate sono state cresciute e selezionate su LBA (10 g/l di triptone, 5 g/l estratto di lievito, 10 g/l di NaCl) con 50 ug/mL di ampicillina. Per la determinazione delle cellule trasformate è stato utilizzato la valutazione bianca/blu tramite X-Gal. Le colonie bianche sono state cresciute in mezzo liquido e quindi isolati il DNA plasmidico tramite “Montage cell extraction kit” della Millipore. I plasmidi sono stati sequenziati tramite reazione con BigDye (AppliedBiosystem) usando 50ng di DNA plasmidico e AppliedBiosystem 3100 Avant.

## Discussione

Per ottenere un mappaggio ad alta risoluzione dei *Ol-qt12* e *Ol-qt13* sul cromosoma 12 di pomodoro sono stati sviluppati nuovi marcatori in modo da saturare la zona di interesse. Durante la generazione di questi marcatori sono stati frequenti i casi in cui primer costruiti su sequenze RFLP, COS e COSII non hanno amplificato alcuna banda. Ciò è attribuibile alla scarsa presenza di informazioni per il locus di interesse nella specie *S. neorickii*. D'altra parte il successo delle amplificazioni PCR dipendono da molti fattori, tra cui le condizioni di reazione e il ciclo di amplificazione adottato. Notevole importanza ha anche la sequenza che si utilizza come riferimento per la costruzione del primer. Infatti, se è scelta come riferimento una sequenza con elevata omologia tra le specie saggiate e se le condizioni scelte per le analisi sono ottimali, la maggior parte delle reazioni allestite producono un amplificato. In questo lavoro oltre 80% dei marcatori sviluppati a partire da sequenze RFLP hanno prodotto un amplificato. L'alta percentuale di successo nel caso di marcatori RFLP è da attribuire al fatto che le sequenze utilizzate per la costruzione dei primer derivano da DNA genomico di pomodoro. Quando invece la sequenza di riferimento per la costruzione dei primer deriva da frammenti espressi (cDNA o EST) e/o da specie lontane, e si usa DNA genomico come template per la reazione di PCR, sono più elevati i casi di insuccesso. In alcuni casi la presenza di introni porta alla produzione di ampliconi talmente grandi da non poter essere amplificati dalla *Taq polimerase* nelle condizioni utilizzate. Questa potrebbe essere la ragione per la quale sono stati amplificati solo una parte dei marcatori COS e marcatori COSII.

Un'altra ipotesi per spiegare lo scarso successo nell'amplificazione di COS e COSII è che le specie da cui sono stati prodotti questi marcatori sono molto lontane filogeneticamente dalle specie usate. Il caso della mappa EXPEN2000 e della mappa dei marcatori COS e COSII di *Arabidopsis* è un tipico esempio di mappe tra specie lontane. Solo alcuni dei marcatori presenti nella mappa di *Arabidopsis* sono stati inclusi nella mappa di pomodoro EXPEN2000. Alcune sequenze potrebbero addirittura non essere presenti nelle linee parentali utilizzate nell'analisi poiché il processo di evoluzione e la ricombinazione genetica hanno modificato l'assetto genomico, come dimostrato da Rana *et al.* (2004). In altri casi sono stati ottenuti pattern di bande multiple probabilmente perché esistono molti omologhi alla sequenza in esame. Ovviamente il numero di sequenze COS o COSII utilizzate in questo lavoro non sono un numero sufficiente per formulare un'ipotesi, ma sicuramente la spiegazione per la bassa percentuale di amplificazione può essere attribuita ad una delle due precedenti ipotesi.

Per quanto concerne l'identificazione del polimorfismo tra i parentali, questa dipende del tipo di sequenza utilizzata per disegnare i primer. Generalmente, in pomodoro è molto difficile determinare un polimorfismo intraspecifico e/o interspecifico. Nell'incrocio *S. lycopersicum* x *S. neorickii* sono state individuate zone con basso livello di polimorfismo; tra queste la zona centromerica del cromosoma 12 (Fulton *et al.*, 1999). Nel presente

lavoro di tesi, nella stessa regione, è risultato difficile individuare frammenti PCR polimorfici. Per evidenziare polimorfismi tra le specie di pomodoro, alcuni frammenti monomorfici, derivanti dalle due specie in esame, sono stati sequenziati e per comparazione è stato determinato il polimorfismo. In molti casi esso è risultato solo puntiforme e non è stato facilmente utilizzabile per la produzione di marcatori CAPS. dCAPS potrebbero essere sviluppati in futuro sfruttando i polimorfismi puntiformi identificati per saturare la zona di interesse con nuovi marcatori come è riportato da Avila et al (2007). Interessanti sono le informazioni disponibili per la stessa regione cromosomica in patata. Infatti, sequenze di marcatori AFLP e RFLP o di cloni BAC di patata sono state utilizzate per costruire la mappa dettagliata del locus *Ol-qt12* (van der Voort et al 1997). La traslazione delle informazioni da patata a pomodoro, e viceversa, è una strategia molto usata dato che queste due specie appartengono allo stesso genere e aventi un unico ancestratore comune (Olmstead & Palmer, 1997). Precedenti lavori hanno mostrato che il pomodoro e la patata hanno un cariotipo molto simile e contenente una simile quantità di DNA nucleare (0.7 pg) (Bonierbale et al., 1998). Tanksley et al (1992) hanno dimostrato che il genoma di pomodoro e patata differisce solo per cinque inversioni paracentriche. Tenendo presente queste similitudini, in questo studio sono stati costruiti anche primer degenerati basati sui geni *Gpa2* e *Rx*, isolati nella regione sintenica *Ol-qt12* in patata. Essi, tuttavia, non hanno amplificato nessun frammento genomico. Ulteriori analisi saranno necessarie per capire se omologhi di questi geni (sul braccio corto del cromosoma 12) siano comunque coinvolti nella resistenza a *Oidium*.

Per avere una mappa satura di marcatori co-dominanti i dieci marcatori sviluppati sono stati applicati alla mappa costruita utilizzando la popolazione F<sub>1</sub>BC<sub>2</sub>. La densità di distribuzione dei marcatori lungo la mappa di linkage per il locus di interesse in questo studio ha avuto un andamento eterogeneo. I marcatori TG180, U216669, CT79 e C2\_At2G06530, infatti, delimitano una zona meno satura rispetto al resto della mappa (Fig. 5). I marcatori TG180, U216669, CT79 hanno una distanza tra loro comparabile alla distanza riscontrata nella mappa Tomato-EXPEN2000 del SGN. La distanza tra il marcatore CT79 e il marcatore C2\_At2g06530 è differente tra le due mappe analizzate. Infatti, la distanza tra il CT79 e il C2\_At2g06530 nella mappa *S. lycopersicum* x *S. neorickii* è di 5 cM, mentre, nella mappa EXPEN2000 è di soli 0.2 cM. La differenza in termini di distanza è data da un incremento del numero di individui ricombinanti tra i due marcatori. Questo aumento di individui ricombinanti potrebbe far ipotizzare una regione "hot spot" nella specie *S. neorickii* non presente in *S. pennelli* (parentale selvatico per l'EXPEN2000) Gli "hot spot" sono regioni caratteristiche dei loci di resistenza che sono sottoposte ad un'elevata pressione selettiva e quindi a ricombinazione (Nishant & Rao, 2005). I nostri risultati potrebbero essere spiegati anche ipotizzando la presenza di uno spot di eterocromatina, formato durante l'evoluzione, nella zona di interesse nel parentale selvatico della mappa Tomato-EXPEN 2000. I marcatori che vanno dal marcatore Ct121 al marcatore TG360, invece, hanno evidenziato una stretta associazione. Tanksley et al. (1992) hanno suggerito che le regioni aventi alte densità di marcatori (nel presente studio la regione tra i marcatori CT121 e TG111) corrispondono a zone centromeriche e in alcuni casi a zone telomeriche dove le ricombinazioni sono ridotte. L'intervallo tra i marcatori TG360 e TG111 in questo studio è caratterizzato da eterocromatina, come descritto da Budiman et al. (2004). La presenza di eterocromatina nella zona di interesse spiega l'elevata densità di marcatori rilevata in questa area cromosomica. Infatti, la regione al di sotto del TG360, risulta ancora più vicina al centromero rispetto alla regione compresa tra il CT121 e il TG360. I marcatori, che vanno dal CT121 al centromero, hanno mostrato una perfetta collinearità con la disposizione ottenuta nella mappa Tomato-EXPEN 2000 ma differenti distanze genetiche tra i marcatori.

Le differenze in termini di distanze genetiche tra le due mappe possono essere attribuite ad un ri-arrangiamento della regione (Tanksley et al., 1992). Mutazioni nella regione di interesse tra le specie potrebbero ostacolare la ricombinazione in meiosi e influenzare la distanza dei marcatori nelle mappe di linkage. Le differenti distanze individuate tra i loci in differenti regioni potranno essere investigate e risolte sia utilizzando la sequenza completa del genoma di pomodoro e effettuando esperimenti FISH (fluorescent in-situ hybridization). Infatti, durante gli esperimenti è risultato chiaro che la regione terminale del braccio corto del cromosoma 12 identificata dai marcatori TG180 e T0659, nell'incrocio *S. lycopersicum* x *S. neorickii*, è stata interessata da un'inversione se comparata alla mappa Tomato-EXPEN 2000 (Fig. 5). Tenendo in considerazione la posizione, la distanza dei locus e il numero di individui della popolazione, è possibile che l'inversione possa essere dovuta, anche, ad un'errata determinazione della condizione genotipica di uno o più individui. Comunque dai risultati ottenuti è risultato evidente che la regione interessata dall'inversione non influenza il QTL qualsiasi sia la posizione dei marcatori.

Dai risultati ottenuti dalle analisi di associazione del QTL è evidente che sul braccio corto del cromosoma 12 di pomodoro è presente un unico QTL. Il profilo LOD del QTL identificato, utilizzando 168 individui di una popolazione  $F_1BC_2$ , mostra un'elevata differenza con il profilo identificato da Bai et al (2003) utilizzando la popolazione  $F_2$  che ha prodotto gli individui utilizzati in questo lavoro. La maggiore differenza è la presenza, di due QTL di resistenza nella mappa prodotta da Bai et al (2003), e un unico QTL nella mappa prodotta nella presente tesi. In letteratura è stata valutata l'improbabilità dell'esistenza di due QTL in una regione di 25cM. Tanksley (1993) ha riportato che quando si identificano due QTL in un piccolo intervallo con una popolazione ristretta (<20cM & n<500) molto probabilmente uno di questi risulta un falso positivo. L'algoritmo utilizzato per il mappaggio del QTL ha mostrato, in un intervallo di confidenza del 95%, l'esistenza di un effetto sulla resistenza da parte del *Ol-qt12*. La regione associata alla resistenza è di 45 cM sul braccio corto del cromosoma 12 (Fig.6). Come in tutti i lavori di mappaggio di QTL la regione risulta molto ampia (van Ooijen, 1992; Hyne et al., 1995). Li et al (1999) ha dimostrato che l'algoritmo "interval mapping" (che è stato usato nel nostro caso) è un metodo molto potente per determinare i QTL. D'altra parte però, simulazioni con una popolazione  $F_2$  di 300 individui, hanno mostrato che l'effetto del QTL è associato ad una regione di 30cM per un intervallo di confidenza del 95%. Al fine di evitare il problema di QTL ad effetti molto ampi e della determinazione di QTL inesistenti altri tipi di approcci possono essere usati. Il "multiple QTL mapping" è un approccio molto utile in questi casi (Jansen, 1993; Jansen & Stam, 1994). Mediante l'utilizzo di questa tecnica è stato possibile confermare l'assenza del *Ol-qt13* sul braccio corto del cromosoma 12 in prossimità del *Ol-qt12*. Precedenti lavori hanno dimostrato che il tipo e la grandezza della popolazione di segregazione, la distribuzione e il tipo di marcatori sono dei fattori che influenzano l'analisi per la determinazione del QTL (van Ooijen, 1992). Un altro fattore da tenere in considerazione è che gli individui nelle  $F_2$  hanno delle differenze morfologiche che rendono difficili, molte volte, l'analisi fenotipica. In oltre i marcatori AFLP, che sono stati i marcatori con cui è stata sviluppata la mappa  $F_2$ , in combinazione con il ridotto numero della popolazione hanno portato alla identificazione del falso positivo.

Dai risultati ottenuti nella presente tesi su tre famiglie segreganti risulta evidente che è presente un solo QTL nella regione di interesse per la resistenza a *O. neolyopersici* sul cromosoma 12, chiamato *Ol-qt12*. Dai risultati ottenuti risulta anche chiaro che il metodo utilizzato per determinare il grado della malattia e le popolazioni scelte sono state appropriate per determinare la localizzazione del QTL usando l'analisi di associazione. Infatti, è stato determinato con accuratezza la localizzazione del locus per QTL. Price (2006) riporta che è possibile identificare il gene che assolve la funzione di QTL, mediante l'approccio "candidate gene", in una regione di circa 1-2cM intorno al punto medio del



picco per un QTL che ha un effetto in un intervallo di 30 cM. Questo vale a dire che volendo utilizzare un approccio per geni candidati bisogna investigare una regione di circa 4 cM. Quindi nel caso trattato in questa tesi, il gene potrebbe essere contenuto nell'intervallo delimitato dai marcatori cLET-8-K4 e CT129 dato che il picco del QTL è situato al centro dei due marcatori. Con i dati ottenuti dal "fine mapping" del *Ol-qt12* è stato possibile confermare l'ipotesi di Price (2006) dato che il locus dell'*Ol-qt12* è racchiuso in una regione di 8-6cM. Un approccio che ha dato buoni risultati in altri casi è stato l'utilizzo di informazioni derivanti dalla microsintenia tra le specie vegetali. A tal proposito potrebbero essere usate delle informazioni di sequenza da *Arabidopsis* taliana dato che il marcatore C2\_At416710 è compreso nella regione del mappaggio fine essendo comune alla mappa di pomodoro EXPEN2000 e la mappa di *Arabidopsis*. Infatti, è stato osservato la possibilità di utilizzare la microsintenia tra due regioni in specie molto distanti come potrebbero essere *Arabidopsis* e pomodoro (Oh. Et al 2002) quindi potrebbero essere studiate sequenze in associazione con questo marcatore. Oh e associati (2002) applicando la microsintenia tra *Arabidopsis* e pomodoro hanno ristretto la regione di localizzazione per il gene *diageotropica* (*dgt*) in pomodoro da 0,8 cM a 0,2 cM e associato alla regione due BAC. Studi condotti nella famiglia delle Solanaceae inerenti ai geni di resistenza hanno portato alla scoperta di "cluster" di geni di resistenza localizzati nelle stesse regioni in differenti specie. Infatti, Simko e collaboratori (2004) hanno identificato l'omologo al gene *Ve1* di resistenza a *Verticilium dahliae* isolato sul cromosoma 9 di pomodoro, in patata. La particolarità è che il gene *StVe1* conferisce resistenza allo stesso patogeno. In base alla sintenia e a studi di genetica comparata per i geni di resistenza nella famiglia delle Solanaceae (Tanksley et al., 1992), l'*Ol-qt12* è stato mappato in una zona conosciuta per la presenza di geni di resistenza (Grube et al., 2000), di geni quantitativi per la resistenza (QRL) e di analoghi a geni di resistenza in una regione di circa 15cM. Due geni di resistenza molto importanti sono stati isolati in patata nella regione di interesse. Questi sono il gene *Gpa2* e *Rx1* che rispettivamente conferiscono resistenza al nematode *G. pallida* e al virus X della patata i quali appartengono alla classe LZ-NBS-LRR dei geni di resistenza. Inoltre nelle vicinanze di questi due geni funzionali sono stati trovati altri geni non funzionali ma omologhi ai precedenti (van der Vossen et al., 2000). Inoltre nella regione di interesse sono stati mappati dei QRL che conferiscono resistenza a *P. infestans* (Gebhardt and Valkonen, 2001). Di maggiore interesse è la localizzazione del gene *Lv* identificato in *S. chilense* che conferisce resistenza verticale a *L. taurica*, un altro agente della muffa polverosa in pomodoro. Questo gene è stato mappato nel cluster di geni indicato da Grube et al (2000) nella esatta posizione del mappaggio fine del *Ol-qt12* (Chungwongse et al., 1997). Lefebvre e collaboratori (2003) hanno riscontrato la presenza di alcuni QTL di resistenza in peperone nella stessa regione del *Ol-qt12* che conferiscono resistenza alla specie *Oidium neolycopersici*. Anche una mappa di associazione di pomodoro dimostrano la localizzazione di un gruppo di RGA nella regione associata al gene *Lv* (Zhang et al., 2002) e quindi associata al *Ol-qt12*. D'altra parte non possiamo ignorare la possibilità che la funzione del QTL è assolto da geni coinvolti nelle pathway di resistenza. Ad esempio questi geni possono essere coinvolti nella resistenza innata o nelle difese basali come collegamento tra QRL e i geni associati alla difesa come descritto da altri autori (Gebhardt and Valkonen, 2001 & Jafary, 2006).

Nel presente studio è stato individuato anche un fattore epistatico che influenza la resistenza nella popolazione  $F_1BC_2$  non identificato utilizzando la popolazione  $F_2$  di 104 individui. Infatti, con la  $F_2$  è difficile attribuire il fenotipo suscettibile ad un possibile locus epistatico dato il ridotto numero di individui che si hanno. Infatti, la condizione di omozigosi per l'allele resistente al locus *Ol-qt12* e omozigote per l'allele suscettibile al locus epistatico è poco rappresentata. Il mappaggio degli *Ol-qt1* nella popolazione  $F_2$  è risultato molto

difficili date le differenze morfologiche riscontrate in  $F_2$  quindi Bai e collaboratori (2003) avevano già ipotizzato la presenza di altri *Ol-qt1*. Una tecnica basata sulla “Bulk Segregant Analysis” (BSA) combinata all'uso di marcatori multilocus AFLP ha permesso di identificare in breve tempo marcatori legati al putativo locus epistatico al *Ol-qt2* per la resistenza alla muffa polverosa. In particolare sono stati individuati 10 AFLP polimorfici tra il pool resistente e quello suscettibile, ma tutti derivanti dal parentale resistente per il locus epistatico. Statisticamente, la probabilità di osservare un marcatore dominante presente nel pool-R ma assente nel pool-S e non associato al fenotipo analizzato, è data dalla funzione  $[1 - (1/4)^n] \times (1/4)^m$  (n e m; Dimensioni del pool-resistente e dimensione del pool-suscettibile).

Rispettivamente) (Michelmore e al. , 1991). Nel caso in questione risulta difficile anche la quantificazione del grado di resistenza essendo il carattere quantitativo e molto probabilmente influenzato anche da altri “minor gene”. Tuttavia, anche tenendo presente la possibilità di altro “minor gene”, tramite la relazione descritta precedentemente si ha una probabilità di  $9,3 \times 10^{-5}$  ( $(3/4)^{9+4} \times 1/4^4$ ). Questo significa che la probabilità di associazione casuale tra una banda e il fenotipo resistente è molto bassa. Tuttavia se si considera che sono stati identificati 10 pattern molto ripetitivi e che il valore per la comparsa di bande casuali non associate al fenotipo è di  $8,6 \times 10^{-9}$  possiamo concludere che le bande (circa lo 0,9 delle bande totali) osservate sono associate al fenotipo. Inoltre ulteriori studi di associazione hanno dimostrato la localizzazione in un unico gruppo di linkage per tutti i marcatori associati al putativo locus. Al fine di evitare falsi positivi, i marcatori candidati sono stati verificati con successo utilizzando due pre-NIL omozigoti per *Ol-qt2* ma con due gradi di resistenza differenti (Fig. 11) confermando la presenza dell'allele resistente solo nella NIL resistente. Quindi possiamo concludere che la BSA abbia dato dei risultati validi ed è stato un ottimo strumento per l'identificazione del locus sconosciuto. La presenza di individui con l'allele resistente al locus epistatico ma con fenotipo suscettibile (Fig. 11) potrebbe far pensare ad una segregazione tra il locus e i marcatori. Al fine di evitare il problema della dissociazione tra il marcatore ed il locus in esame, CAPS marker identificativi della regione potrebbero essere sviluppati e utilizzati per analisi con i due pool di DNA al fine di trovare un marcatore strettamente associato al locus o che desse il pattern atteso. Quindi risulta utile la produzione di una mappa di associazione costituita da marcatori CAPS uniformemente distribuiti nella regione di interesse in modo da associare un determinato marcatore ai dati fenotipici. Shen e al. (2003) indicano la BSA uno strumento non appropriato alla determinazione di QTL che possono essere condizionati da altri “minor gene” o quando il QTL è lontano (quindi poco associato) dal marcatore. Tuttavia gli stessi autori hanno dimostrato che è possibile, tramite l'utilizzo della BSA, determinare QTL con piccolo effetto aumentando il numero degli individui della popolazione. Altro aspetto da discutere è il disequilibrio nella determinazione di bande polimorfiche. Infatti, le 10 bande polimorfiche sono tutte derivate da *S. neorickii* e nessuna da *S. lycopersicon*. La spiegazione potrebbe essere attribuita al fatto che tra le specie si ha una sintonia tra le regioni ma che la stessa regione può essere più piccola o addirittura assente. Nei cereali è noto che il numero, in termini di copia, dei geni con domini NBS/LRR (geni di resistenza o omologhi) possono variare tra le specie e addirittura tra le cultivar. In questa specie il numero di questa classe di geni *R* può variare da molte copie a zero (Leister e al. , 1998). In letteratura risultano molti lavori nei quali la determinazione del locus epistatico è stata fatta utilizzando popolazioni con i locus interessati e analisi statistiche appropriate. Generalmente si pensa ad un fenomeno epistatico, quando c'è una deviazione dalla perfetta linearità tra il fenotipo e il genotipo per un determinato carattere ad un determinato locus. Russell & Rodney (2005) hanno descritto un effetto epistatico come il mascheramento o la determinazione di un fenotipo differente che si ottiene dopo l'interazione tra due alleli a differenti loci. Eshed e al. (1996)



ha dimostrato che l'epistasia è un fattore importante nella determinazione del valore fenotipico e questo fenomeno è molto più frequente di quello che si può aspettare considerando solo il caso. Nel caso della presente tesi è stato ipotizzato un effetto epistatico data l'osservazione che alcune piante omozigoti per l'allele *Ol-qt12* resistente sono comunque risultate suscettibili. In questo caso si ha un effetto drastico sul fenotipo, dato che, in assenza del locus epistatico le piante risultano suscettibili. La grande differenza in fenotipo, tra le piante che mostrano l'allele per il locus epistatico e non, fanno affacciare l'ipotesi che il gene al locus epistatico può interagire con il gene espresso dal locus *Ol-qt12* o che possa far parte del pathway in qualche punto cruciale. Una simile interazione epistatica è stata determinata, anche, nell'interazione muffa polverosa con il peperone. Infatti, Lefebvre e collaboratori (2003) hanno determinato la presenza di due loci epistatici, associati uno al cromosoma 2 e un altro ad un gruppo di linkage sconosciuto, al QRL, localizzato nella stessa regione del *Ol-qt12*, nel genoma di peperone. Zhu e associati (2003) hanno dimostrato la presenza di due QTL dal nome *Pcq1* e *Pcq2* che hanno un effetto molto particolare. Infatti, è stato determinato che il QTL *Pcq1* ha un effetto molto maggiore sulla resistenza in campo e sia in piantine che in piante adulte. Variando le condizioni da pieno campo a condizioni controllate (in serra) è stato dimostrato che allo stato di piantina l'avena risulta essere suscettibile anche mostrando un genotipo resistente al locus *Pcq1*. Ulteriori studi hanno confermato che per avere un fenotipo resistente nelle piantine di avena in serra c'è bisogno del locus *Pcq2* in associazione al *Pcq1*.

In conclusione possiamo affermare che in programmi di miglioramento genetico bisogna tenere in considerazione possibili interazioni epistatiche.

La colocalizzazione del *Ol-qt12* con una regione ricca di geni di resistenza e di RGA (van der Vossen et al., 2000 & Zhang et al., 2002) fanno ipotizzare che il prodotto del *Ol-qt12* locus possa essere un omologo a questi geni. Analisi bioinformatiche hanno permesso di identificare un BAC associato al locus di interesse. La sequenza BAC è stata identificata dal marcatore cLET-8-k4 il quale è localizzato in prossimità del massimo valore del QTL. Sulla sequenza BAC è stata identificata la presenza di un omologo al gene di resistenza *Pto*. Il gene *Pto* è un membro di una famiglia multigenica e codifica per una serina-treonina proteina chinasi che media la resistenza a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* che esprime il gene *AvrPto* (Chang et al., 2002). Una proteina chinasi è una proteina capace di modificare altre proteine tramite la fosforilazione. Nella maggior parte dei casi queste proteine intervengono nella cascata del segnale. Quindi si potrebbe ipotizzare che il locus *Ol-qt12* contiene un gene omologo a *Pto* che è importante nell'individuazione del patogeno e/o nella cascata del segnale. Il marcatore COSII C2\_At4g16710, che è localizzato nella regione del *Ol-QTL2*, ha una forte omologia con una "carbohydrate binding protein" di *Arabidopsis thaliana*. La funzione di questa tipologia di geni è recettoriale e legano la cellulosa, la chitina e i polisaccaridi. Anche queste funzioni possono essere correlate all'interazione della pianta con un patogeno che tenta di penetrare all'interno della pianta. Li et al. (2005) studiando il profilo di espressione delle piante contenenti diversi *Ol-qt1* ha evidenziato un frammento trascritto espresso solo nelle piante contenenti l'*Ol-qt12*. L'allineamento di questa sequenza in banca dati ha mostrato un'alta omologia tra questo frammento trascritto e una "GTP-binding protein". Questo gene potrebbe essere un buon candidato per la funzione di QTL, ma al momento non è stato ancora mappato. Ulteriori studi condotti nella presente tesi hanno evidenziato la presenza di diversi BAC di cui è disponibile la sequenza nella regione di interesse. Dalle analisi bioinformatiche è risultato che il contig, costituito dai tre BAC C12Hba0146119, C12Hba0211M21 e C12Hba0093E12 associato al marcatore T1446, è localizzato in prossimità del massimo valore del LOD. Da analisi bioinformatiche condotte sulle sequenze dei BAC è stata evidenziata la presenza e l'espressione di alcune sequenze

omologhe ai geni *Cf* di resistenza. I geni di resistenza *Cf*, come il gene *Pto*, sono caratterizzati da un'organizzazione in cluster e hanno dimostrato che differenze alleliche tra le specie possono conferire la stessa resistenza. Cinque geni *Cf* sono stati isolati e in tutti i casi è stato possibile osservare la presenza di una serie di geni omologhi ai geni funzionali. I geni *Cf* appartengono ad una categoria di geni che costituiscono un gruppo a se nella classificazione dei geni di resistenza. Infatti, presentano un dominio extracellulare e una breve coda transmembrana senza nessun dominio citoplasmatico. Studi condotti su questi geni hanno evidenziato, infatti, che i geni *Cf* hanno bisogno di proteine accessorie per la trasduzione del segnale all'interno della pianta. L'evidenza che i geni *Cf* necessitano di fattori accessori potrebbe essere traslocata al locus *Ol-qt12*. Infatti, anche il locus *Ol-qt12* ha necessità di un locus accessorio per esplicitare la sua funzione di QTL.

Sebbene sono stati fatti molti progressi nella comprensione dei meccanismi di resistenza, risulta difficile capire come funziona il pathway attivato dal *Ol-qt12* con solo una mappa di linkage. Sfortunatamente il caso studiato in questa tesi è un patosistema poco conosciuto e del quale sono note poche informazioni. Da questo lavoro di tesi, comunque, sono risultati chiari alcuni aspetti tra cui l'evidenza di un locus epistatico che interagisce con l'*Ol-qt12* per esplicitare la resistenza tramite HR (Li, 2005). Date le evidenze si può ipotizzare che la resistenza parziale conferita dal *Ol-qt12* in combinazione al locus epistatico prevede la presenza di un recettore da parte della pianta nel patosistema, sebbene non è chiaro se il recettore è localizzato al locus *Ol-qt12* o al locus epistatico. Utilizzando l'ipotesi del guardiano sviluppata da Bogdanove (2002) si potrebbe pensare che il sistema in esame funziona in questo modo: uno dei locus identificati funziona come recettore per i possibili elicitori del patogeno, mentre l'altro locus potrebbe funzionare in modo accessorio. Quindi si ha la formazione del complesso ligando-recettore si attiva la cascata del segnale dove è presente anche il locus accessorio. In assenza o con variazioni alleliche di uno dei due fattori (come visto nella analisi genetiche) può portare ad una reazione di tipo compatibile anziché incompatibile. In ogni caso è da capire perché, anche avendo una reazione di interazione recettore-ligando, non si ha una reazione di resistenza completa. In effetti, ci sono molte cause che potrebbero influenzare l'espressione genica tra cui le variazioni alleliche ai due locus, il background genetico, il genotipo del patogeno e degli elicitori espressi, ma anche lo stadio di sviluppo e i fattori ambientali (Niks and Lindhout, 2000). Nell'interazione del gene *Cf1* è stata evidenziata una resistenza totale o parziale di resistenza a seconda dell'allele presente nel genoma di pomodoro. Anche il gene *I2* conferisce due differenti gradi di resistenza a seconda della variazione allelica come il gene *Pa3* che conferisce differenti gradi di differenza in base al background (Niks and Lindhout, 2000). In questi casi, la resistenza incompleta può essere attribuita a variazioni alleliche nell'interazione recettore-ligando o all'interazione con altri geni presenti nel genotipo o a incompatibilità nella cascata del segnale dovuta a proteine che non sono capaci di interagire ad alta affinità dati i background differenti. Una spiegazione alternativa potrebbe essere che il complesso formato dall'elicitore e dal recettore non ha una corretta conformazione e questo non interagisce con il pathway di risposta in Moneymaker. Si può ipotizzare, quindi, che entrambi i parentali hanno il recettore per la ricognizione dell'elicitore. La differenza tra i due parentali potrebbe avere dovuto al fatto che il locus *Ol-qt12* del genotipo selvatico esprime un gene che produce una proteina con la corretta conformazione del complesso per determinare la resistenza. Li et al. (2005) hanno dimostrato che c'è un overlapping tra le interazioni resistenti sia monogeniche che poligeniche con la reazione di suscettibilità dopo l'inoculo con *Oidium neolycopersici* supportando l'ipotesi che il complesso elicitore-recettore si potrebbe formare ma che nella reazione di resistenza l'attivazione del pathway è repentina. Infatti, le uniche differenze determinate sono attribuibili all'evoluzione dell'espressione nel tempo. In aggiunta i geni isolati nel lavoro di Li et al (2005) sono geni coinvolti nella trasduzione del

segnale, fattori di trascrizione e di traduzione. Il lavoro di Li potrebbe a pensare che in entrambi i parentali fossero presenti dei recettori ma che funzionassero con affinità diversa. McDowell e Woffenden (2003) hanno ipotizzato un modello nel quale la pianta suscettibile esprime una quantità di geni *R* ma solo quando un altro gene *R* o un set di gene *R* sono introgressi la progenie diventa resistente ad un patogeno o ad una serie di patogeni. La resistenza conferita dal locus *Ol-qt12* in associazione al locus epistatico potrebbe essere simile al sistema *Pto-AvrPto* o al sistema *Cf9-Avr9*. Nella regione di interesse sono stati trovati degli omologhi a questi geni e quindi risultano di buoni candidati. Il gene *Pto* è localizzato in un cluster di geni dove è presente che un gene accessorio che è il gene *Prf*. Il gene *Prf* è un gene con un dominio NBS-LRR indispensabile per la resistenza. Da studi condotti da questa interazione ancora oggi non è stata evidenziata un'interazione diretta tra i due geni per esplicitare la resistenza. Il legume, invece, tra uno dei geni *AvrPto* o *AvrPtoB* con il gene *Pto* è necessario per la cascata di fosforilazione. L'attivazione del gene *Pto* porta all'attivazione del gene *Prf* da cui è attivata un tipo di resistenza definita *Prf* dipendente che si esplicita con l'inibizione della crescita dal batterio (Bernal et al., 2005). Al fine di capire meglio il meccanismo di funzionamento dei loci epistatici saranno necessarie informazioni aggiuntive derivanti anche da altre interazioni. Nello studio di un fattore epistatico individuato per un QTL che determina l'antibiosi nell'interazione pianta-insetti in *Brassica* è stato dimostrato che i geni candidati per il ruolo di QTL possono essere coinvolti in pathway non tipicamente di resistenza ma che interagiscono nel processo di resistenza (McMullen, 2001). Osservazioni istologiche dei parentali resistenti con differente modalità di resistenza (monogenica e poligenica), hanno dimostrato che la percentuale di austori primari e secondari che induce la necrosi è sempre minore negli individui a resistenza poligenica rispetto agli individui a resistenza monogenica. L'HR, nella resistenza poligenica è sempre più lenta ed è attivata in fase di post-austorio (Huang et al., 1998). La lentezza del processo di resistenza portano all'ipotesi che la resistenza poligenica è un macchinario più complesso e più difficile da attivare ma al tempo stesso più duraturo nel tempo. La difesa poligenica, mediata di solito da QTL, porta alla produzione di prodotti antimicrobici, al consolidamento della parete cellulare e alla morte cellulare programmata "host". Tutto questo meccanismo è definito come difesa basale che limita la malattia ed è attivato più lentamente rispetto alla HR tipica (Abramovitch and Martin, 2004 & Heath, 2000). Dal lavoro bibliografico e dai dati ottenuti possiamo pensare che la resistenza di *S. neorickii* G1601 a *Oidium neolycopersici* è una difesa di tipo basale che è venuta ad essere superata nella cv MoneyMaker nel corso della coevoluzione con il patogeno e che data la presenza di fattori epistatici la resistenza potrebbe essere duratura nel tempo.

La seconda parte della tesi di dottorato ha riguardato l'interazione *P.infestans* con una linea di pomodoro trasformata con il gene *R1* di resistenza. La libreria sottrattiva ha portato all'isolamento di diversi geni coinvolti nell'interazione pianta patogeno. La tecnica utilizzata per individuare i geni differenzialmente espressi è stata scelta tra una serie di alternative altrettanto valide come potrebbero essere le analisi microarray, i cDNA AFLP e la SAGE. L'utilizzo della SSH (Diatchenko et. al 1996), come tecnica ha una serie di vantaggi, tra cui l'amplificazione di frammenti rari nel genoma arricchendoli fino a 1000 volte e alla facilità di esecuzione con costi abbastanza ridotti. Lo svantaggio nell'utilizzo di questa tecnica è l'isolamento di falsi positivi (Rebrikov et al 2000). Al fine di eliminare i falsi positivi dall'analisi alcune modifiche sono state apportate da Rebrikov e collaboratori (2000). Infatti, è stata sviluppata una tecnica definita "Mirror Orientation Selection" (MOS) per eliminare la quasi totalità dei falsi positivi. La SSH, anche avendo lo svantaggio dei falsi positivi, è molto utilizzata per le interazioni pianta-patogeni dato che è capace di

sottrarre i geni che derivano dal patogeno e quindi avere una visione globale del solo trascrittoma della pianta. Una delle difficoltà per rendere la tecnica il più informativa possibile nell'interazione pianta-patogeno è la scelta del tempo dopo l'inoculo da utilizzare per la sottrazione. Studi bibliografici o attraverso l'analisi di geni coinvolti nell'interazione in esame possono essere di aiuto per capire il tempo giusto da utilizzare. Dai lavori precedentemente pubblicati è stato possibile notare che la quasi totalità dei lavori utilizza un pool di RNA che deriva dai differenti "time point" presi in considerazione. Ouyang et al (2007) ha studiato la risposta a stress salino in pomodoro tramite SSH utilizzando due piante con differente risposta allo stress e con due pool di RNA derivanti dal mix dei differenti "time point". Nel caso studiato da Lu et al (2005), invece, un singolo campione è stato utilizzato (15 giorni dopo l'inoculo del patogeno) come fonte dell'RNA per studiare i geni espressi durante la reazione di resistenza a *Tilletia tritici* con grano. Da questi due lavori citati possiamo concludere che la scelta del tempo da utilizzare come riferimento per produrre la libreria è funzione del sistema in esame e di quello che si vuole studiare. Studi simili al lavoro di tesi, sono stati condotti da Birch e collaboratori (1999) al fine di determinare i geni precocemente espressi nell'interazione di resistenza tra *Phytophthora infestans* e patata. Questi autori hanno considerato come punto per la sottrazione 24h. A questo stadio gli autori hanno notato che si avevano la prima reazione di ipersensibilità in patata. Il nostro studio ha voluto investigare un intervallo di tempo ancora più breve dall'inoculo. Da studi precedenti è stato dimostrato che il gene Pr1, attivamente coinvolto nella reazione di ipersensibilità a *Phytophthora* mediata da acido salicilico (Fellbrich et al 2002), è differenzialmente espresso nell'interazione già a 6 ore dopo l'inoculo presupponendo l'attivazione del meccanismo di resistenza già a questo time point. Nel lavoro condotto sono stati isolati circa 100 cloni di cui 56 hanno evidenziato un frammento inserito nel plasmide pCR2.1 (Invitrogen). Questo dato è confermato dal lavoro di Birch e associati (1999) nel quale sono stati individuati 100 cloni dei quali 42 hanno mostrato dei frammenti all'interno e 35 geni non ridondanti sono stati isolati. Nel lavoro di tesi il 39% dei cloni sequenziati sono risultati già annotati come geni coinvolti nel processo di difesa o di stress. Il Northern blot e la Real Time PCR sono le tecniche più utilizzate per confermare l'espressione dei trascritti. Il Northern blot ha una serie di vantaggi tra cui la sensibilità nel determinare il trascritto ma anche una serie di svantaggi tra cui la laboriosità del metodo. La tecnica scelta per confermare i dati di espressione differenziale è stata la Real Time PCR relativa utilizzando l'algoritmo  $\Delta\Delta C_t$  (Livak & Schmittgen 2001) per valutare le differenze tra i vari trattamenti e "time point". Gachon e collaboratori (2004) hanno prodotto un lavoro nel quale sono descritte le potenzialità della tecnica Real Time PCR nell'ambito vegetale. Questi autori confermano la sensibilità e la specificità della tecnica. D'altra parte l'alta sensibilità rende la tecnica, in casi dove le differenze sono minime tra i trattamenti, poco riproducibile.

Nello studio dell'interazione tra *P. infestans* e varie specie di pianta sono stati fatti molti passi in avanti. Un largo studio è stato fatto per identificare geni che conferiscono resistenza a tutte le varie razze di patogeno isolato. Circa una decina di *R*-gene sono stati identificati in specie selvatiche di patata, ma solo il gene RB (Song et al 200...) è risultato duraturo nel tempo e non razza specifico. Negli ultimi anni un ruolo di primo piano è stato rivolto allo studio della cascata di resistenza mediata dai geni R. A tal fine Birch et al (1999) hanno studiato, tramite tecniche di espressione differenziale, la risposta precoce di patata dopo l'inoculo e Tian et al (2006) hanno studiato l'espressione genica in una risposta di tipo orizzontale nell'interazione patata-peronospora. La tecnica della SSH è stata scelta in questi studi per individuare geni completamente sconosciuti ma di notevole importanza per il fenomeno esaminato. Attraverso l'analisi differenziale tramite SSH in molti casi è stato possibile individuare geni a funzione non nota e poi quindi caratterizzarli

come nel caso del GH3-like coinvolto nella maturazione del frutto di peperone (Liu et al 2005).

Nel presente studio sono stati annotati in modo preciso i 56 trascritti differenziali identificati nella libreria in modo da assegnare un ruolo biologico a ciascuno. I 18 trascritti scelti per le analisi di PCR Real Time sono stati scelti tra i geni coinvolti nel processo di resistenza.

Nella presente tesi il clone 21 è stato identificato tramite BLASTn come omologo al gene della catalasi 1 in pomodoro isolato da Drory & Woodson (1992). La proteina codificata dal gene della catalasi ha la funzione di detossificare la cellula dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS). I ROS sono delle molecole radicaliche molto reattive che in associazione con il perossido di idrogeno hanno un'attività antimicrobica. Dal lavoro di Bissink & Oliver (2001) risulta evidente che la catalasi, nel caso di *Cladosporium fulvum*, risulta essere un gene di virulenza quindi espresso dal patogeno. Infatti, gli autori credono che la catalasi espressa dal patogeno può giocare un ruolo nella degradazione dell' $H_2O_2$  esogena prodotta dalla pianta nella reazione di resistenza. Analizzando più catalasi derivanti da più specie differenti è stato possibile riscontrare un'alta omologia tra le specie in esame. Nel presente lavoro il gene CAT1 è risultato identico al gene isolato in pomodoro. Questo è risultato differenzialmente espresso tra i vari trattamenti e in particolare tra la reazione di resistenza e suscettibilità ed è risultato evidente un possibile coinvolgimento di questo gene nella reazione di resistenza. Dai dati ottenuti si potrebbe ipotizzare che la catalasi intervenga in modo più repentino nella reazione di resistenza rispetto alla reazione di suscettibilità per detossificare la cellula e quindi ristabilire le normali attività metaboliche. La seguente ipotesi è anche supportata dal lavoro di Diqui et al (1999) dove è risultato evidente che la risposta mediata da acido salicilico a *P. infestans* è associata ad un'attivazione dell'espressione della classe II delle catalase. Inoltre, gli stessi autori hanno trovato che la SAR (Sistemic Acquired Resistance) è attivata in seguito all'over-espressione della catalase II con un conseguente aumento della resistenza a *P. infestans* in patata. I risultati ottenuti, quindi, fanno ipotizzare un ruolo del perossido di idrogeno nell'interazione studiata. A conferma di questa ipotesi nella libreria sottrattiva è stato isolato il gene HSP70 (Heat Shock Protein). Questo gene è stato studiato in risposta agli stress derivati dall'attivazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). Il lavoro di Shao et al. (2007) ha dimostrato che il promotore del gene HSP70 di *Chlamydomonas reinhardtii* ha una regione che interagisce con l'acqua ossigenata e fa esprimere il gene in questione. Inoltre questo gene è stato studiato nell'interazione del "West Nile virus" con cellule umane confermando il ruolo di chaperone per il corretto ripiegamento della proteina GluB (Oh 2006). Quindi possiamo ipotizzare che, la catalase\_1 e il gene HSP70, sono coinvolti nel processo di resistenza mediato da  $H_2O_2$  aiutando le cellule vegetali a sopravvivere più a lungo con la catalase\_1 che detossifica la cellula e l'HSP70 che aiuta il ripiegamento delle proteine durante la fase di stress. Il patogeno necrotrofo *Botrytis cinerea*, invece, attiva una reazione di morte cellulare programmata in *Lilium* andando a modulare la produzione di  $H_2O_2$  e di ossido nitrico (van Baarlen et al 2004). D'altra parte i patogeni appartenenti al genere *Botrytis*, essendo dei funghi necrotrofici, hanno bisogno di materiale vegetale morto per avere fonte di carbonio. Nell'interazione pomodoro-peronospora è stato individuato il gene "Cell\_death\_1". Un gene simile è stato individuato in *Arabidopsis* ed è risultato evidente la sua over-espressione in seguito alla produzione di specie reattive dell'ossigeno in particolare  $O_3$  (Ahlfors et al., 2004).

Il clone 37 non è risultato connesso al pathway descritto precedentemente. Questo gene è omologo ad una proteina serina-treonina chinasi molto simile alla proteina RLK4 di *Arabidopsis*. Come la CAT\_1, la RLK4 di *Arabidopsis* è coinvolta nei processi di resistenza funghi. La proteina RLK4 è membra di una famiglia di "Receptor-Like protein Kinase". Dal lavoro di Liqun e Zhixiang (2000) è stato dimostrato che le proteine RLK sono indotte dalla  $H_2O_2$ , dall'acido salicilico e dall'infezione patogena. Inoltre le proteine RLK hanno un

motivo di tipo “W box” che fa presupporre un’induzione mediata da proteine “WRKY DNA-binding” anche esse tipiche nei fenomeni di resistenza. In particolare nel lavoro di Liqun & Zhixiang (2000) è evidente che la RLK4, che risulta la più simile al clone 37, è indotta nelle prime ore dopo l’inoculo, ma poi si ha un decremento del trascritto. Questo dato conferma il nostro risultato che vede un incremento dell’espressione a tre ore dopo l’inoculo e poi un graduale decremento a 6 ore. Studi condotti precedentemente hanno dimostrato che il gene Xa21 di resistenza è un membro della famiglia delle RLK ma che funziona come recettore per il patogeno *Xantomonas oryzae* pv *oryzae* (Wang et al. 1998).

## Risultati

Analisi genetica e molecolare di loci coinvolti nella determinazione della resistenza ad *Oidium neolycopersici* in pomodoro.

Allo scopo di determinare la posizione di alcuni “Major Gene” e di geni ad effetto epistatico nella specie *Solanum neorickii*, è stata condotta un’analisi genetica molecolare su tre popolazioni ottenute dall’incrocio *S. neorickii* G1.1601 e *S. lycopersicum* cv Moneymaker. In particolare, è stata studiata la regione del cromosoma 12 associata ai QTL (*Ol-qt12* e *Ol-qt13*), è stato localizzato un putativo gene epistatico e ne è stato valutato l’effetto.

### Mappaggio genetico e fisico di *Ol-qt12* e *Ol-qt13*

La regione del cromosoma 12 associata alla determinazione della resistenza alla muffa bianca del pomodoro è rappresentata da un segmento localizzato sul braccio corto del cromosoma adiacente al marcatore CT129.

Marcatori CAPS e SCAR sono stati sviluppati per indagare in maggior dettaglio la regione cromosomica associata al marcatore CT129. In tabella 1 sono riportate le 54 combinazioni di primer (CP) saggiati sui parentali che sono state disegnate utilizzando sia le sequenze presenti nel SGN database (<http://sgn.cornell.edu/search/>) (37 CP) sia quelle presenti in letteratura (17 CP). I primer disegnati sulle sequenze presenti sul sito SGN derivano da marcatori differenti tra cui 17 RFLP, 8 COS, 6 COSII, 4 unigene e 2 EST. I primer scelti da ricerca bibliografica derivano da RFLP (2 CP), AFLP (3 CP), RAPD (2 CP), BAC clone (6 CP) e da ipotetiche sequenze amminoacidiche dei geni *Rx1* e *Gpa2* (4 primer degenerati) (Tab.1). Da 29 combinazioni di primer dei 54 utilizzati sono stati ottenuti amplificati in entrambi i parentali. Quattro combinazioni di primer hanno amplificato solo in uno dei parentali e quindi sono stati utilizzati come marcatori SCAR. Per le restanti 25 amplificazioni non sono state evidenziate differenze tra i frammenti prodotti nei due parentali. Da 25 combinazioni di primer, utilizzando DNA genomico, in entrambi i parentali sono state prodotte bande monomorfe. Questi amplificati sono stati utilizzati come substrato per reazioni di digestione con enzimi specifici. In seguito alle reazioni di digestioni, utilizzando un totale di 24 enzimi di restrizione, 17 delle 25 combinazioni di primer hanno mostrato un polimorfismo tra i due parentali.

Dieci marcatori CAPS sviluppati sono stati selezionati per condurre ulteriori analisi (tab. 2). Questi sono stati scelti tenendo presente il loro utilizzo per costruire altre mappe di associazione presenti in letteratura e nella mappa di riferimento del progetto di sequenziamento del genoma di pomodoro (EXPEN2000 <http://sgn.cornell.edu/cview/>), al fine di ampliare le informazioni utili per il clonaggio del QTL.

Al fine di mappare i due QTL di resistenza localizzati sul cromosoma 12 di pomodoro sono state utilizzate tre differenti popolazioni. Le tre popolazioni comprendono due  $F_1BC_2$  e una



$F_1BC_3$ . Le due  $F_1BC_2$  sono state rinominate popolazione A e popolazione B mentre alla  $F_1BC_3$  è stato assegnato il nome di popolazione C. Al fine di costruire una mappa di associazione per il braccio corto del cromosoma 12 è stata utilizzata la popolazione A. I dieci primer sviluppati in questo lavoro sono stati integrati con 12 combinazioni di primer già utilizzate sulla popolazione A in precedenti studi per ottenere una migliore risoluzione del gruppo linkage individuato nella zona cromosomica compresa tra il marcatore TG111 e il marcatore TG180. Tale regione presenta una dimensione di circa 51.6 cM e la distanza media risultante tra i marcatori è di 2,3 cM. La regione tra i marcatori CT121 e il TG360 è la zona più satura di marcatori. Le regioni meno coperte da marcatori sono rappresentate dalle aree delimitate dai due marcatori TG180 e C2\_At2g06530, con una distanza inferiore a 5cM (distanza genetica limite per analisi per individuare QTL). Confrontando la mappa di linkage prodotta in questo lavoro con la mappa EXPEN2000 si nota una inversione nella regione telomerica compresa tra i marcatori TG180 e T0659.

L'analisi QTL è stata condotta mediante l'utilizzazione dell'algoritmo "interval mapping" del programma MapQTL. I dati di associazione derivati dall'analisi dei 22 marcatori associati, in combinazione con i risultati dei test di resistenza, hanno mostrato un effetto significativo su *Ol-qtl2*, nella zona compresa tra i marcatori T1185 e TG180, in una regione di circa 45 cM. Il profilo logaritmico della massima probabilità di associazione (LOD: logarithmic of odds) mostra un solo picco compreso tra i marcatori CT129 e cLET-8-K4, in un piccolo intervallo di circa 1.8 cM. Entrambi i marcatori spiegano circa il 30% della variabilità fenotipica nella popolazione in esame.

Tre famiglie ricombinanti per il locus di interesse originate dall'autofecondazione di tre individui appartenenti alla popolazione A sono state scelte per successive analisi. Ciascuna famiglia è stata scelta per valutare il livello di ricombinazione nell'intervallo di localizzazione del locus *Ol-qtl2*. Lo scopo di queste analisi è di individuare in modo più preciso la posizione del QTL identificato tramite analisi di associazione.

In figura 5 è riportata la costituzione genomica dei tre individui  $F_1BC_1$  di partenza utilizzati nell'autofecondazioni (103, 121, 22) per ottenere le popolazioni segreganti. I tre individui mostrano ricombinazione genomica per la zona di interesse. L'analisi delle tre famiglie si è effettuata considerando questi tre possibili casi: 1) nella regione dove è evidenziata omozigosi per uno dei due parentali (resistente o suscettibile) non è attesa una segregazione del carattere; 2) nelle regioni genomiche in cui si evidenziano segmenti sia di provenienza materna che paterna (eterozigosi) si ci attende una segregazione del carattere nella popolazione che ne deriva.

Le tre famiglie in esame mostrano differenze significative tra le medie dei test di resistenza. Il genotipo 103 ha una costituzione genotipica rappresentata da una regione compresa tra il telomero e il marcatore t1263 omozigote per il locus suscettibile derivato dal parentale Moneymaker (Fig. 5). La popolazione che ne deriva (RF103) mostra un fenotipo tutto suscettibile, con una media dell'indice di resistenza 2.4. Si può ipotizzare che il locus sia presente in una regione di omozigosi nel parentale e in particolare una regione omozigote per il parentale suscettibile. Il genotipo 121 ha una costituzione omozigote resistente dal marcatore T0659 al marcatore C2At2g06530, eterozigote dal C2At2g06530 al TG111 e omozigote suscettibile nella restante parte investigata. Effettuando una analisi della varianza sulla popolazione derivante dell'individuo 121 è stato rilevato un effetto **significativo sulla** resistenza della regione genomica compresa tra il C2At2g06530 e il TG111. Nella popolazione RF121 le variazioni fenotipiche sono comprese tra un minimo di 0.7 ad un massimo di 3 nella scala di valori che va da 0 (resistente) a 3 (suscettibile). Per l'ultima popolazione derivante dall'autofecondazione dell'individuo 22 è stata riscontrata una zona eterozigote nella regione tra il marcatore CT79 e il marcatore T1263, mentre si ha omozigosi per il parentale resistente nella zona tra il telomero e il CT79 e omozigosi per il parentale resistente tra il marcatore T1263 e il

TG111. La popolazione ottenuta è stata analizzata tramite analisi della varianza confermando un effetto sul fenotipo da parte dell'intervallo eterozigote tra i marcatori CT79 e T1263.

Alla luce dei risultati ottenuti è stato possibile delimitare l'*Ol-qt12* tra i marcatori c2\_At2g06530 e T1263, in un intervallo di circa 8 cM. Non è stato possibile ridurre ulteriormente l'intervallo di localizzazione dato che non sono stati utilizzati ulteriori marcatori per determinare la posizione dei crossing over. Il "fine mapping" così condotto ha ristretto il locus del QTL di circa 4-5 volte sul braccio corto del cromosoma 12 (Fig. 5).

L'analisi statistica condotta per la zona del marcatore y258, che è stato associato precedentemente al *Ol-qt13*, non ha mostrato alcun picco, e pertanto, è stato considerato non realmente associato alla resistenza ad *O. neolycopersici* (Fig. 4). Anche la regione localizzata dal marcatore y258 è stata analizzata nella popolazione RF103, ma non è stata trovata nessuna cosegregazione tra genotipo e fenotipo confermando l'assenza del *Ol-qt13* (Fig. 5).

I risultati ottenuti della analisi sulla popolazione A hanno evidenziato un solo picco nella regione di interesse in associazione con i marcatori CT129 e cLET-8-k4 cui è stato dato il nome di *Ol-qt12* (Fig. 4-5).

La disponibilità di marcatori co-dominanti e la buona risoluzione di localizzazione ottenuta può essere utilizzata per determinare se questo QTL ha un effetto additivo o dominante sul fenotipo (Bovenhuis et al., 2006). A questo fine 70 piante eterozigoti, 34 omozigoti resistenti e 30 omozigoti suscettibili della popolazione A sono state selezionate per effettuare un'analisi genetica. Il locus *Ol-qt12* mostra un effetto additivo di 0.43. L'effetto dominante è stato stimato a 0,05. Questi risultati potrebbero portare alla conclusione che questo QTL non ha un effetto dominante ma additivo.

#### Mappaggio fisico e analisi genetiche al locus *Ol-qt12*

Una mappa fisica basata sull'utilizzo di BAC ancorati ai marcatori presenti nella mappa EXPEN2000 è in fase di sviluppo come substrato per il progetto del sequenziamento del cromosoma 12 di pomodoro. Per la costruzione della derivante dall'incrocio *S. neorickii* G1.1601 x *S. lycopersicum* cv Moneymaker sono stati usati marcatori presenti nella mappa EXPEN2000 utilizzata come riferimento per il progetto di sequenziamento. Al fine di ottenere una mappa integrata è stata condotta un'analisi di confronto tra le due mappe. In particolare, nella regione delimitata mediante mappaggio genetico con la popolazione derivante dall'incrocio *S. neorickii* x *S. lycopersicum* sono stati identificati tre BAC associati a tre differenti marcatori presenti nella regione del locus *Ol-qt12*. I marcatori sono il T0989, il T1667 ed il cLET-8-k4. Tutti questi marcatori sono localizzati nella regione di interesse tra i marcatori C2\_At2g06530 e il cLET-8-k4. Dalla mappa integrata si evince che il marcatore T1667 è associato alla sequenza del BAC C12Hba146I19 e che tale marcatore presenta la massima associazione con il marcatore CT129 che identifica il picco del QTL. I BAC C12Hba0146I19, C12Hba0211M21 e C12Hba0093E12 costituiscono il contig di interesse. La macro molecola formata dalle sequenze dei BAC C12Hba0146I19 e C12Hba0211M21 è stata utilizzata in analisi di predizione genica tramite software GENESCAN. Le stesse sequenze sono state sottoposte ad analisi BLAST utilizzando il database unigene nel SGN website (<http://sgn.cornell.edu/tools/blast/>). I risultati delle analisi BLAST sono stati integrati ai risultati di predizione genica. Tre differenti sequenze codificanti, due nella regione 3' e una nella regione 5' della macro molecola, sono state individuate come possibili candidate per la funzione di *Ol-qt12* (Fig. 7). I geni sono risultati omologhi ai geni *Cf* di resistenza a *Cladosporium fulvum*. Le sequenze localizzate nella regione 3' (P1 e P2) sono state sottoposte ad ulteriori analisi. Per la regione P1 sono stati disegnati due combinazioni di primer mentre per la regione P2 quattro combinazioni.



Entrambi i primer per la regione P1 (p1-1-OI-qtl2 e p1-2-OI-qtl2) e due primer per la regione P2 (p2-1-OI-qtl2 e p2-2-OI-qtl2) hanno prodotto amplificato utilizzando DNA genomico (Tab. 3). Le quattro combinazioni di primer sono state utilizzate anche per amplificare cDNA. La combinazione di primer p1-1-OI-qtl2 ha mostrato un prodotto di amplificazione nella cv MoneyMaker, mentre non ha amplificato con il cDNA di G1.1601. Il primer p1-2-OI-qtl2 ha prodotto amplificazione in entrambe le specie in esame. Analogo risultato è stato ottenuto con le combinazioni di primer p2-1-OI-qtl2 e p2-2-OI-qtl2. La prima combinazione di primer, infatti, non ha amplificato utilizzando il cDNA del genotipo selvatico (Fig. 8). I frammenti ottenuti sono stati sequenziati e quindi allineati con la sequenza del rispettivo BAC di identificazione. Le sequenze allineano perfettamente con il risultato che le sequenze amplificate sono espresse dalla regione di interesse e sono diverse tra le due specie analizzate.

#### Identificazione di un locus epistatico

Analizzando geneticamente popolazioni segreganti per resistenza ad *O. neolycopersici* derivanti dall'incrocio *S. neorickii* x *S. lycopersicum* sono stati notati dati di segregazione distorta. In particolare, quando la popolazione C (n=40) è stata sottoposta sia a test di resistenza che ad analisi genetiche, essa ha mostrato segregazione per il tratto di interesse al locus *OI-qtl2*, ma non ha mostrato segregazione a livello fenotipico. Infatti, l'indice di resistenza (D.I.) di questa popolazione ha un valore medio di 2.9 e una deviazione standard di 0.1. I test statistici di associazione, inoltre, non hanno mostrato una correlazione tra la condizione genetica e il fenotipo. Anche nella popolazione A sono stati evidenziati alcuni risultati che confermano questi dati. In particolare 23 dei 30 individui omozigoti per il locus resistente nella popolazione A hanno mostrato un D.I. inferiore a 2 (valore minimo considerato per la resistenza) mentre, i rimanenti 7 hanno mostrato un D.I. maggiore. Dati di associazione discordanti tra il locus per il QTL e i dati fenotipici sono stati ottenuti analizzando altre popolazioni. Per valutare la possibilità che un altro locus potesse interagire con il locus *OI-qtl2* al fine di conferire resistenza a *Oidium neolycopersici* è stato allestito un esperimento di analisi molecolare sul parentale suscettibile e resistente e su due pool di DNA ottenuti rispettivamente da genotipi resistenti (R-pool) e suscettibili (S-pool) omozigoti per il marcatore associato al locus *OI-qtl2*.

In particolare per identificare marcatori associati alla resistenza alla muffa bianca è stato effettuato un AFLP "fingerprinting" dei parentali e di due pool di DNA con 70 combinazioni di primer. Al fine di valutare i parentali sono state utilizzate un totale di 42 combinazioni di primer MseI/EcoRI. Trentasei sono state ripetibili, producendo una media di 61 bande per coppi di primer. Un totale di 1340 bande sono risultate polimorfiche tra i parentali, (circa il 61% delle totali) di cui 718 dal parentale resistente (G1.1601) e 622 dal parentale suscettibile MM.

Quando le combinazioni di primer, saggiate sui parentali, sono state applicate ai due pool (R-pool e S-pool) non ha portato a nessun pattern del tipo presenza/assenza di banda, ma solo un pattern nel quale il R-pool ha mostrato una banda ad intensità maggiore rispetto al S-pool. Le combinazioni di primer che, hanno mostrato questa condizione nei due pool, nei parentali hanno evidenziato la presenza della banda nel parentale resistente e l'assenza nel parentale suscettibile. Questo tipo di pattern nei due pool è stato rilevato per un totale di 10 bande polimorfiche derivanti da 7 combinazioni di primer.

Quindi le sette combinazioni di primer sono state applicate, in analisi AFLP, sui 17 individui formanti i due pool. Ai singoli individui sono stati aggiunti i due parentali come controllo e due pre-NIL (NIL2a e NIL2b) aventi D.I. 0.7 e 1.8 rispettivamente. Dodici delle 17 bande polimorfiche (circa lo 0.9% delle bande) hanno mostrato polimorfismo nei

parentali e nei singoli individui, comprese le due pre-Nil. Le bande sono state identificate in tutti gli individui resistenti (G1. 1601 e pre-NIL2a) ma anche in alcuni individui del pool suscettibile. La combinazione di primer E35M55-460 hanno mostrato un comportamento co-dominante. Gli 8 individui del pool resistente sono omozigoti per l'allele resistente al locus d'interesse o eterozigote, mentre gli individui suscettibili sono eterozigoti o omozigoti per l'allele suscettibile. Dal profilo di questo marcatore possiamo anche distinguere inequivocabilmente che la NIL2a ha una condizione eterozigote al locus in esame.

Tre dei 17 marcatori AFLP polimorfici sono stati analizzati per segregazione nella mappa  $F_2$  (*S.neorickii* G1.1601 x *S.lycopersicum* cv Moneymaker) già utilizzata da Bai *et al.* (2004) per determinare gli *Ol-qt1*. La popolazione è costituita da 104 individui ed è composta di circa 380 marcatori AFLP e da circa 20 marcatori CAPS cromosoma-specifici. Utilizzando il programma JoinMAP4 è stato determinato che i tre marcatori polimorfici mappano nello stesso gruppo di linkage in associazione con altri marcatori già presenti nella mappa. Nessun CAPS era associato al gruppo di linkage per determinare la localizzazione cromosomica. L'integrazione della mappa  $F_2$  prodotta da Bai *et al.* (2003) con la mappa  $F_3$  utilizzata da Finkers *et al.* (2007) più ricca di marcatori cromosoma-specifici ha permesso di localizzare il locus fosse localizzato al cromosoma 3 individuando l'associazione delle tre bande con il marcatore Tg599.

Ulteriori marcatori CAPS sono stati sviluppati per determinare l'effettiva localizzazione del locus considerando i precedenti risultati. Sono stati ottenuti 9 marcatori cromosoma 3-specifici sulla base delle sequenze presenti nella banca dati del SGN (<http://sgn.cornell.edu/cview/>). Per ognuna delle amplificazioni con primer specifici sono state ottenute bande singole di lunghezza compresa tra 500 bp e 1500 bp (Tab. 4). Gli amplificati, ottenuti in entrambi i parentali, sono stati purificati e quindi sottoposti a reazione di restrizione con 24 enzimi. Per cinque dei nove marcatori è stato trovato un polimorfismo ripetibile e molto chiaro dopo reazione di restrizione che ha permesso di discriminare i due parentali. Per ottenere altri marcatori associati al locus epistatico, due marcatori AFLP, associati al locus di interesse, sono stati isolati da gel di poliacrilammide e sequenziati. Sulle sequenze ottenute sono state disegnate due combinazioni di primer testate sui parentali. Il marcatore AFLP derivante dalla banda E35M52-280 derivata ha amplificato un'unica banda (SN280), mentre il marcatore derivante dalla banda AFLP E35M52-305 ha amplificato bande multiple e quindi non è stato utilizzato per ulteriori analisi. Il marcatore 280SN è stato convertito in CAPS. I sei nuovi marcatori sono stati applicati alla popolazione  $F_2$  e tutti hanno mappato in associazione con i tre AFLP precedentemente localizzati. Inoltre, il marcatore 280SN è stato mappato nello stesso gruppo linkage associato al locus e in stretta associazione con il marcatore C2\_At5g38880. Tutti i marcatori associati al locus epistatico sono stati raggruppati tra i marcatori cLPT-2-E21 e C2\_At5g63460. Dalla comparazione tra la mappa ottenuta per la regione di interesse del cromosoma 3 e la EXPEN2000 si nota una perfetta identità.

Altre popolazioni segreganti sono state utilizzate al fine di determinare l'effettiva localizzazione del locus individuato sul cromosoma 3 nella esplicitazione della resistenza quantitativa alla muffa polverosa. Analisi condotte per il locus epistatico sulla popolazione  $F_1BC_3$  che mostrava un fenotipo suscettibile e una segregazione genotipica al locus *Ol-qt1/2* hanno evidenziato omozigosi per l'allele suscettibile al locus presente sul cromosoma 3. Inoltre, anche nella popolazione  $F_2BC_2$  è stata rilevata una condizione omozigote al locus *Ol-qt1/2* e una segregazione a livello fenotipico. Le analisi condotte su 10 campioni di questa popolazione hanno mostrato che le cinque piante più resistenti hanno il marcatore associato al locus, mentre le piante suscettibili non presentano la banda associata.

La sequenza del marcatore 280SN è stata allineata mediante analisi BLAST con il database delle sequenze terminali di BAC (BAC-end) di pomodoro sviluppato per il progetto di sequenziamento del genoma di pomodoro (<http://sgn.cornell.edu/cview/>). Due

BAC-end hanno mostrato un'alta omologia con la sequenza in esame. Le due BAC-end sono risultate, inoltre, in un allineamento "plus/minus" tra loro. Per confermare la localizzazione di questi BAC al locus di interesse sono stati sviluppati marcatori CAPS BAC-specifici per le BAC-end. In particolare il BAC Le\_Hba116a06 è stato localizzato nella zona di interesse con entrambi i marcatori per entrambe le estremità. PCR condotte con i primer specifici per il marcatore 305SN utilizzando come DNA target i BAC SL\_EcoRI0003E23 e Le\_Hba116a06 e i parentali, hanno mostrato lo stesso profilo di amplificazione, confermando che i BAC sono localizzati nella regione di interesse.

#### Analisi molecolare dell'interazione pomodoro-*Phytophthora infestans*

Allo scopo di studiare il processo di resistenza e suscettibilità a *P. infestans* in pomodoro è stata valutata l'interazione di piante transgeniche per il gene *R1* di pomodoro con due isolati di peronospora che determinano, rispettivamente, reazione di resistenza e suscettibilità. A tal fine è stata costruita una libreria SSH di cDNA utilizzando RNA collezionato durante la reazione di resistenza e di suscettibilità. I frammenti prodotti dalla libreria sottrattiva sono stati clonati e sequenziati. I geni isolati sono stati analizzati tramite Real Time PCR.

Le piante utilizzate per questo studio sono state selezionate in una popolazione segregante della linea trasformata L17 con il gene *R1* di resistenza a *Phytophthora infestans* isolato in patata. La progenie di autofecondazione della linea L17, valutate per la presenza del gene *R1* con saggio molecolare, sono state utilizzate in un test di resistenza con la razza 1 e 0 di *Phytophthora infestans*. Tutte le foglie inoculate delle piante analizzate con la razza 1 hanno mostrato una reazione di ipersensibilità, mentre tutte le foglie inoculate con la razza 0 hanno evidenziato sempre lo sviluppo del micelio del fungo. Al fine di condurre l'analisi di espressione differenziale è stato estratto l'RNA a tre differenti intervalli (time point; T.P.) dopo l'inoculo (0,5, 3 e 6 "hours post inoculation") delle piante trasformate con le due razze di patogeno. Il T.P. di riferimento per produrre la libreria sottrattiva è stato 6 ore dopo l'inoculo (6 hpi).

La libreria ha prodotto circa 100 colonie. I frammenti clonati all'interno del vettore pCR2.1 sono stati caratterizzati tramite PCR su colonia per valutare le colonie positive al clonaggio e per determinare la grandezza dei frammenti che è variata da 150 bp a 500 bp. Dalle 100 colonie di partenza 56 hanno presentato l'inserito e sono state coltivate in mezzo liquido. Da tutte le 56 colonie è stato estratto il plasmide ricombinante e quindi sequenziato. Le sequenze dei cloni sono state sottoposte ad analisi BLAST e dai dati di omologia è stato possibile raggruppare le sequenze in base al ruolo funzionale svolto nella cellula. Nell'ambito delle 56 sequenze, il 39% risulta essere rappresentato da geni che possono rientrare nel processo di resistenza, il 26% ha mostrato omologia con geni a funzione sconosciuta, il 9% con proteine coinvolte in varie vie metaboliche, un altro 9% è rappresentato da sequenze COSII derivati da *Arabidopsis* a funzione sconosciuta, il 7% codifica per proteine coinvolte nel ripiegamento delle proteine (chaperoni) e da altri geni con funzioni specifici (Fig. 11). Nel gruppo dei geni coinvolti in processi di difesa troviamo omologia con sequenze coinvolte nel processo di resistenza (12%), nella morte cellulare programmata (4%), nella risposta a stress (7%) ma anche geni come l'ubiquitina (6%), la pectina metilase (2%) e le poliproteine (7%). In tabella 4 sono riportati i geni scelti per ulteriori analisi in base alla funzione e alla loro implicazione nel processo di resistenza.

Tutte le sequenze selezionate sono state sottoposte ad analisi bioinformatiche in modo da ottenere una annotazione più precisa per questi geni. In tabella 4 è riportata la caratterizzazione effettuata per le 18 di queste sequenze. Per tutti i cloni è stata

identificata la sequenza unigene consenso corrispondente di pomodoro nel SGN database (<http://sgn.cornell.edu/tools/blast/>). Inoltre le sequenze 46, 38, 88, 49 e 76 sono state localizzate su specifici BAC posizionati sulla mappa EXPEN2000 di pomodoro e sequenziati (Tab. 4). In quattro casi non è stato possibile identificare la posizione fisica, ma è stata determinata una identità di questi cloni con delle sequenze che identificano marcatori. I geni Pr1 e PAL (Tab. 5) sono stati utilizzati in analisi comparative di espressione per i geni indicati nella tabella 4

#### La catalasi

Le sequenze 76 e 21 codificano per un gene omologo ad una catalasi (*CATA1\_LYCES Catalase isozyme 1*). L'unigene corrispondente che allinea con queste due sequenze è il SGN-U312411. Inoltre, le sequenze allineate utilizzando il database delle sequenze dei BAC completi disponibile nel sito del SGN (<http://sgn.cornell.edu/tools/blast/>) hanno portato alla localizzazione della sequenza sul BAC C12Hba0115G22 sul braccio lungo del cromosoma 12. La modalità di espressione di questo gene durante il processo di resistenza è stata valutata mediante analisi Real Time PCR.

Per la sequenza di interesse è stata costruita una coppia di primer e sono state condotte analisi tramite Real Time relativa utilizzando i differenti time point. Osservando i dati di reazione Real Time si evince che il gene ha una espressione differenziale nei differenti trattamenti. Infatti, non c'è alcuna differenza di espressione tra i T.P. nelle reazioni di suscettibilità, mentre si nota un incremento da 1 a 1.5 nel passaggio da 3 hpi a 6 hpi nella reazione compatibile.

#### Serina treonina proteina chinasica

La sequenza 37 ha una identità del 99% con l'unigene SGN-U313935 e una omologia (circa il 91%) con un recettore-simile serina-treonina proteina chinasica di *Solanum tuberosum* (PRK-1) e con un recettore-simile serina-treonina proteina chinasica chiamata RLK4 identificata in *Arabidopsis* individuato nella reazione di resistenza a *Pseudomonas syringae* DC 3000. Poiché chiaramente coinvolta nei processi di resistenza, essa è stata scelta per ulteriori analisi. La sequenza è stata sottoposta ad analisi BLAST utilizzando il database dei marcatori molecolari e delle sequenze BAC di pomodoro ma non è stato possibile identificare la localizzazione nel genoma di pomodoro. Anche in questo caso PCR Real Time sono state condotte sui campioni di cDNA ottenuti a diversi intervalli post-inoculo. Andando ad analizzare l'espressione del gene 37 in relazione al tempo e al tipo di interazione si evince che il trascritto si esprime 2.5 volte in più rispetto al gene *Ef1* 0,5 ore dall'inoculo. Successivamente decresce e rimane costante nelle reazioni di resistenza (Fig 13). Dopo 3 ore si può notare una differenza di espressione tra i due tipi di interazioni analizzate. Si nota, infatti, una espressione più elevata nella reazione di resistenza (2 volte maggiore) ad una espressione più bassa (minore di 1) nella reazione suscettibilità. A 6 dopo l'inoculazione possiamo notare che l'espressione è minore di 0,5 nella reazione di resistenza mentre è circa 1 nella reazione di suscettibilità. Inoltre, l'espressione tra i due time point nella reazione di suscettibilità sembra non essere statisticamente differente. In conclusione il gene sembra avere un andamento decrescente durante il fenomeno di suscettibilità mentre mantiene una espressione costante nella reazione di resistenza (Fig. 13).

#### Beta-glucosidase

La sequenza 47 è stata allineata, utilizzando il programma BLAST, al database degli unigene di pomodoro. La sequenza è risultata con una identità del 90% con la unigene SGN-U312681 di pomodoro omologa alla *Beta-glucosidase*, ma non è stato possibile mapparla mediante i database disponibili.

Per la reazione di resistenza è stato possibile effettuare un'analisi di espressione ai tre intervalli di tempo dopo l'inoculazione a 0,5, 3 e 6 ore. L'andamento del grafico di espressione, nella reazione di resistenza, è crescente fino a 3 ore dopo l'inoculo per poi decrescere a 6 ore dopo l'inoculo (Fig.14). Invece per quanto riguarda la variazione di espressione rilevata nella reazione suscettibile tra i time point a 6 e 3 hpi è stata evidenziata una significativa riduzione d'espressione.

#### *Pr1 e PAL*

I geni *Pr1* e *PAL* sono stati scelti in quanto noti per essere coinvolti in diversi sistemi di interazione pianta patogeno. Le reazioni di PCR Real Time sono state condotte su tutti i campioni a disposizione. Dal grafico possiamo evidenziare che sia la *PAL* che la *Pr1* hanno una espressione di che va da 2,5, per la *PAL*, a 3, per la *Pr1* volte maggiore al gene *Ef1*. L'evoluzione della variazione di espressione, nel corso del tempo e tra le interazioni, cambia a seconda del gene esaminato.

La *PAL* ha un incremento di espressione dopo 0,5 ore dopo l'inoculo, ma poi ha un decremento a 3 e 6 ore dopo l'inoculo in entrambe le interazioni. Infatti, da un massimo di 2,5 volte maggiore del gene di riferimento si passa a un valore minore 0,5 volte.

La *Pr1* ha un comportamento analogo al gene *PAL* nei primi momenti dell'interazione. Infatti, questo gene è espresso in modo consistente dopo 0,5 ore dall'inoculo (circa 2,5 volte maggiore). Dal grafico si evince anche che il gene *Pr1* ha un comportamento diverso passando da interazione compatibile ad incompatibile e tra diversi time point. Infatti, le espressioni maggiori sono state rilevate nella reazione di resistenza (si passa da 0.5 a 1) e si può anche vedere che andando avanti con la reazione di resistenza (reazione incompatibile a differenti time point) si ha un incremento di espressione (da 1 a circa 2 volte il gene di riferimento).

#### Confronto i geni identificati, *PAL* e *PR1*

Confrontando l'andamento di espressione dalla catalasi con i geni *PAL* e *PR1* si nota che questo gene ha una espressione basale molto più bassa rispetto agli altri. Infatti, se utilizziamo l'espressione del trascritto della *Catalase\_1* come riferimento, si evince che a 0.5 ore dall'inoculo la *Pr1* e la *PAL* hanno una espressione 2,5 volte maggiore e la *Beta-glucosidase* ha una espressione minore. Analisi di real time PCR indirizzate al confronto della sequenza 37 con i geni *PAL* e *Pr1* hanno evidenziato che il trascritto omologo alla serina treonina proteina chinasica ha un andamento paragonabile all'espressione degli altri due geni.

Il gene *Beta-glucosidase* ha andamento un diverso se paragonato ai geni *Pr1* e *PAL*. Infatti, ha sempre una espressione più alta della *PAL* in tutti i time point e in tutte le interazioni, mentre ha valori più alti della *Pr1* a 3 ore dopo l'inoculo e valori più bassi a 6 ore dopo l'inoculo. Ciò è particolarmente evidente nella reazione di resistenza (Fig.14).

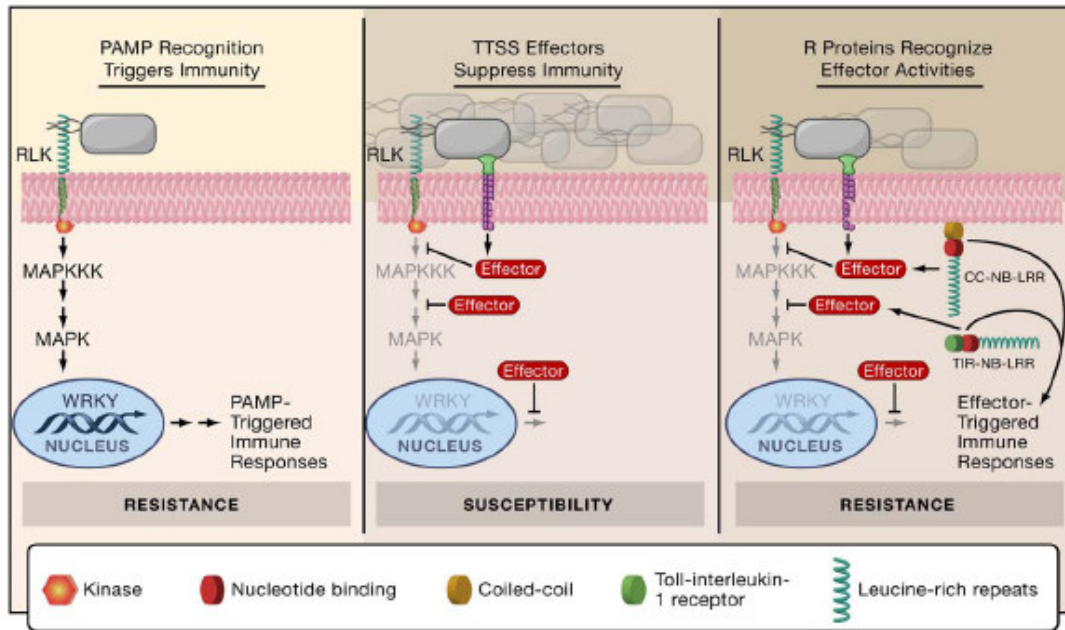


Fig.1) Rappresentazione dell'interazione pianta-patogeno secondo Chisholm et al 2006. A sinistra è rappresentata la reazione di resistenza tramite "PAMP-Triggered Immunity" (PTI), al centro la reazione di suscettibilità nei casi in cui il patogeno supera la PTI e a destra la reazione di resistenza "Effectors-Triggered Immunity" (ETI)

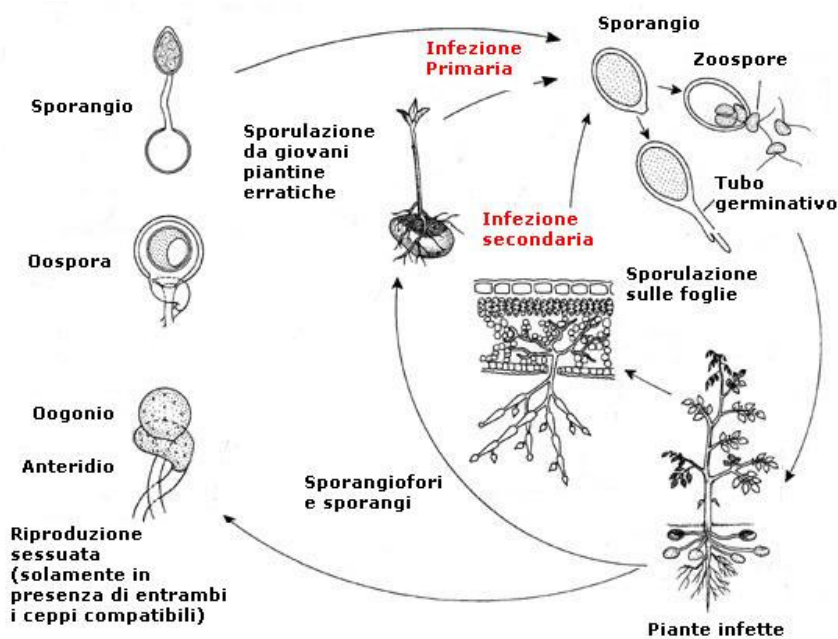
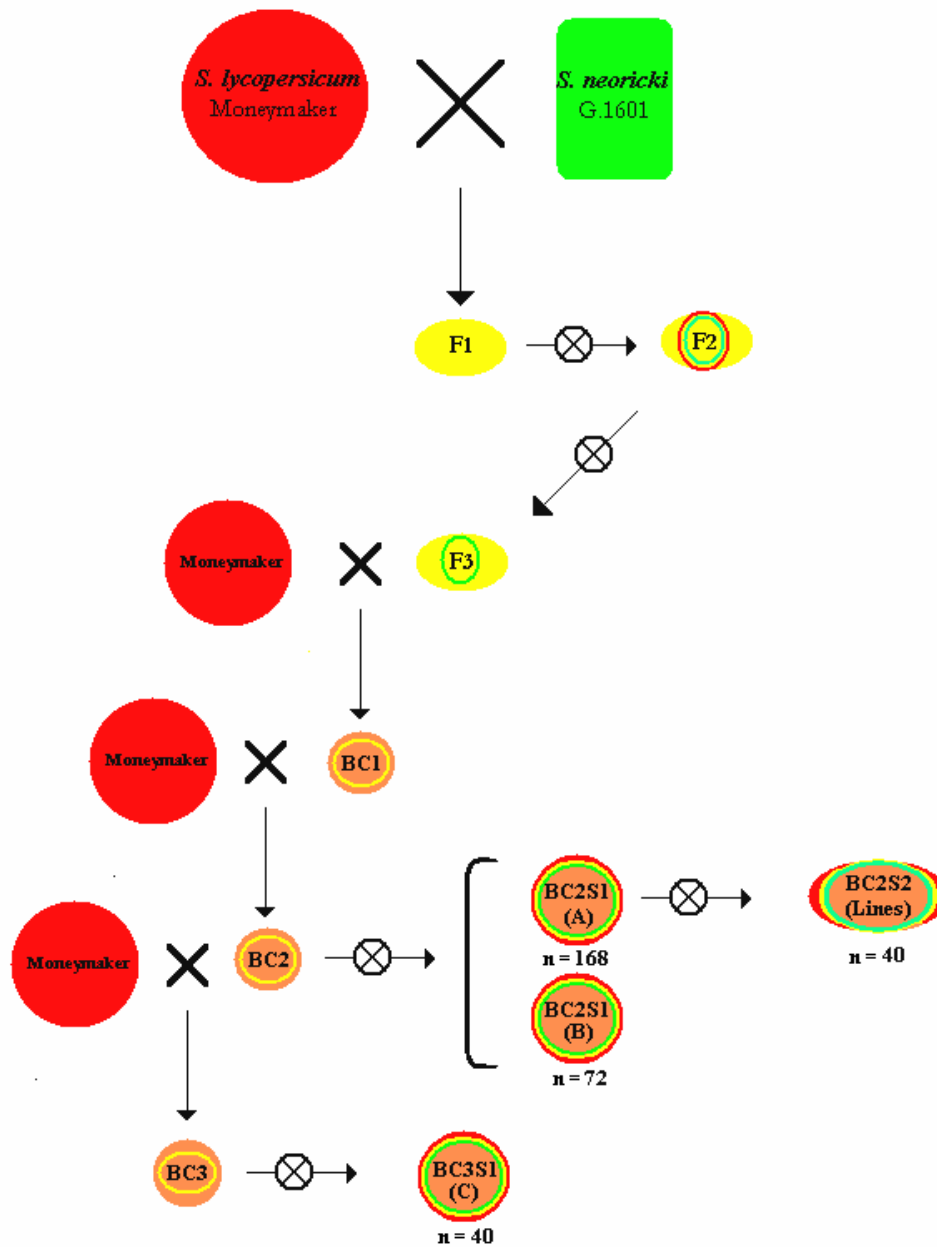


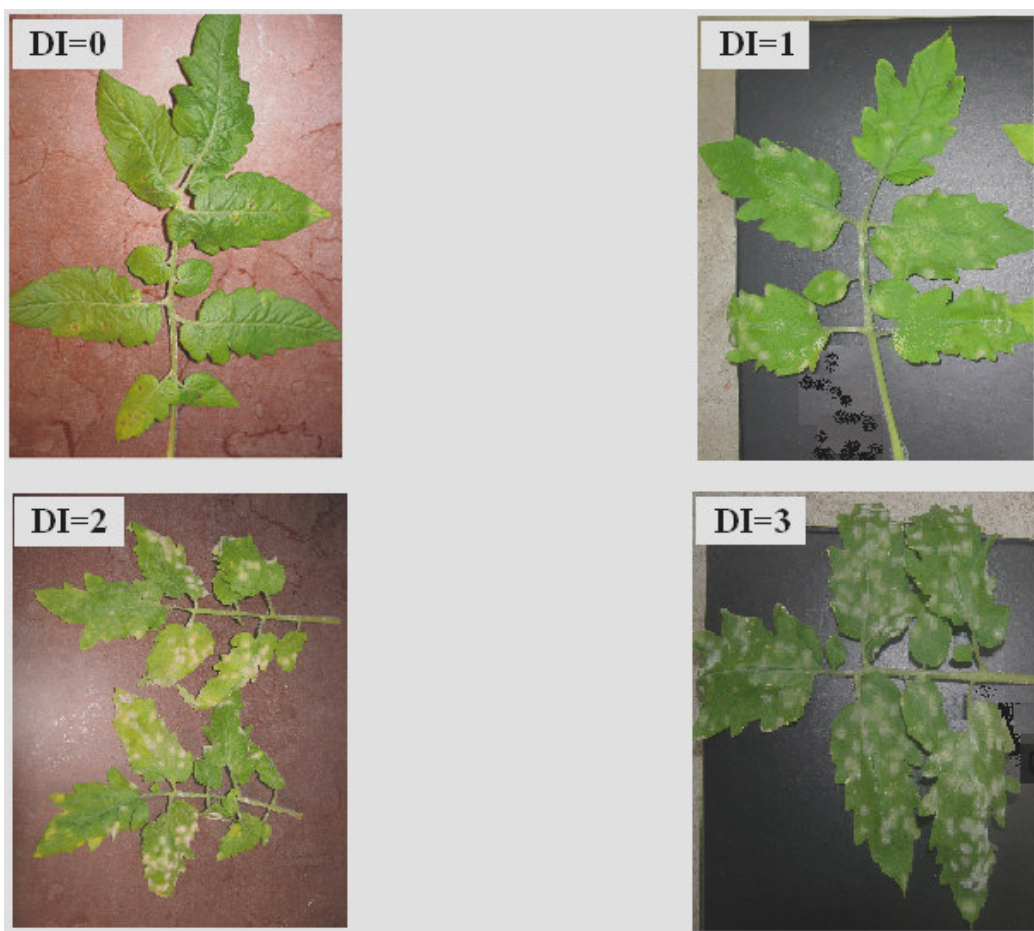
Fig.2) Ciclo sessuale e asessuale dell'agente della peronospora del pomodoro *Phytophthora infestans*





**Fig. 3)** Schema delle popolazioni di reincrocio utilizzate.

In rosso e in verde sono rappresentati il genoma rispettivamente il parentale suscettibile e il parentale resistente e in giallo indicano la condizione eterozigote. Il colore dei crechi indicano il genotipo delle popolazioni per le regione dei QTL al cromosoma 12. "n" indica il numero delle popolazioni



**Fig.4)** Schema per assegnare i valori di malattia (“disease index” D.I.)

Le figure indicano il livello di sporulazione dopo l'inoculo di *O.neolycopersici* e i corrispondenti D.I. per una maggiore accuratezza anzhe i decimali sono applicabili. Le foglie con D.I. =0 hanno una tipica reazione di resistenza mediata da risposta ipersensibile

Tab.1) Sequenze utilizzate nello sviluppo dei marcatori CAPS

Tipo di sequenza	Primer		CAPS/SCAR	
	Disegnati	Amplificati	Sviluppati	Usati
RFLP	19	16	9/2	4
COS	8	3	1/0	1
COSII	6	3	1/0	1
BAC	6	2	2/0	1
Unigene	4	2	2/0	1
AFLP	3	1	1/0	1
EST	2	1	0/1	0
RAPD	2	2	1/1	1
Peptide	4	0	0/0	0
Totale	54	29	17/4	10



Tab.2) Elenco dei marcatori CAPS sviluppati per il locus *Ol-qt1* al braccio corto del cromosoma 12

Nome	Sequenza primer	tm	Grandezza del frammento	Enzima di restrizione	Origine		
					Tipo	Nome	Referenza*
111R	R: ggaccgggtggtattactat F: caaatttgtgcaaagtga	50-60	470	<i>MspI</i>	RFLP	CT79	SGN
TG180	R: ccgtgtaatatccaacgag ctt F: ctgcattggcagaagattca	55	300	<i>XapI</i>	RFLP	TG180	SGN
T0659	R: gggcaaataaactgttctc a F: aatggcatggaatgggaa a	55	1400	<i>HhaI, PstI</i>	COS	T0659	SGN
U216669	R: cataccattttcccgatg F: taggcgttatggatggcttc	60	2000	<i>AluI</i>	Unigene	U216669	SGN
c2_At2g06530	R: atctgtcccattgccttgtaac c F: aagggtgtctccctcagaatt cag	56	900	<i>RsaI</i>	COSII	c2_At2g06530	SGN
CT121	R: attgaaacttggggcttgtg F: gtgtagccagggtggtggact	56	270	<i>HaeIII</i>	RFLP	CT121	SGN
NR14A	R: gtggcaggtatctcatgga a U: gggaacctccatatacaag	56, 2	700	<i>PstI</i>	RAPD	NR14A/R	Yaghoobi et al. (1995)
GP34	R: gttatcgttgatttctcgttccg F: cggtgctaggtgaagcatga agaag	45	700	<i>HpyCH4IV</i>	RFLP	GP34	Bendahmane et al. (1997)
IPM3	R:	49	700	<i>DdeI</i>	AFLP	IPM3	Bendahmane

	caacatcactgatcagac F: agtagtttcaggctagt						ane et al. (1997)
111R	R: gagatgaagattttctgtct gatgg F: ccactgtgtaagggtcaact atagtc	46, 8	750	<i>RsaI</i>	BAC	111R	Bendahm ane et al. (1997)

\*SGN data base (<http://www.sgn.cornell.edu>)

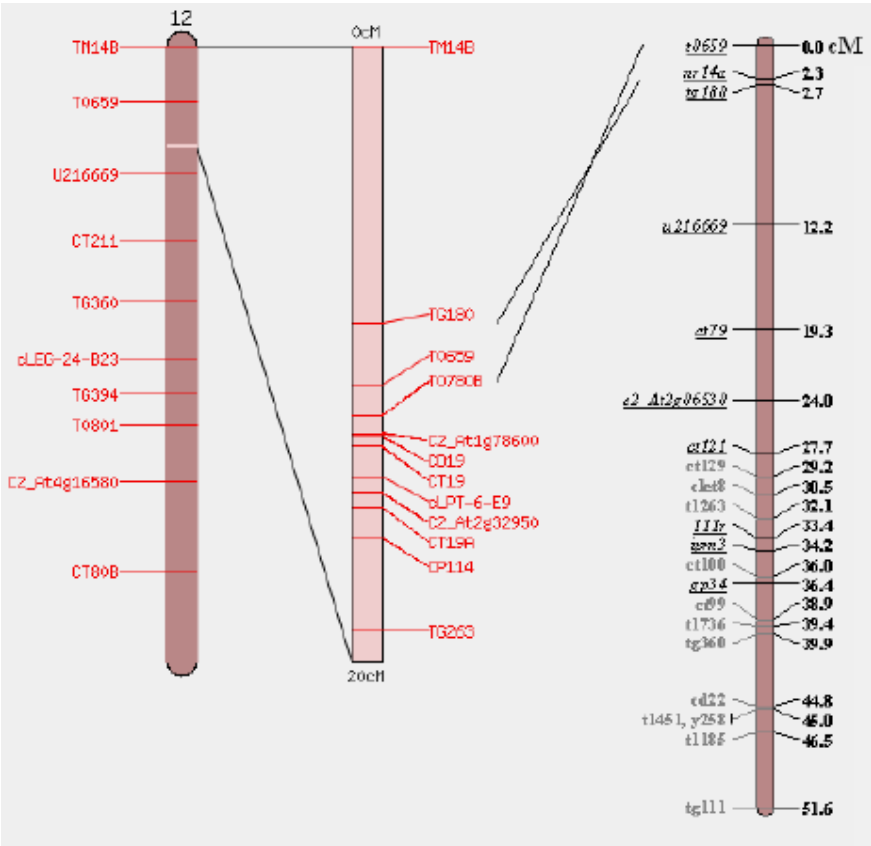


Fig. 5) comparazione di ordine e posizione tra i loci nelle due mappe. (A): mappa di associazione EXPEN2000 per la regione di interesse sul cromosoma 12 derivata dall'incrocio *S. lycopersicum* x *S. pennellii* (Fulton et al., 2002). (B): mappa molecolare sviluppata nel presente studio per il locus di interesse sviluppata dall'incrocio *S.*

Marker

LOD Score

LOD Profile

0.0 cM

2.3

2.7

12.2

19.3

24.0

27.7

29.2

30.5

32.1

33.4

34.2

36.0

36.4

38.9

39.4

39.9

44.8

45.0

46.5

51.6

1

3

5

7

9

11

13

Fig. 7) costituzione genica dei tre individui F1BC2 utilizzati per sviluppare F2BC2. La barra superiore rappresenta la mappa di associazione per il locus dei due Ol-qtI sul cromosoma 12. Le barre sottostanti rappresentano la costituzione genica dei tre individui F1BC2 ricombinanti nella regione per gli Ol-qtI. I numeri a sinistra corrispondono rispettivamente al numero dell'individuo e al grado di resistenza (D.I.). In verde gli individui sono omozigoti per i marcatori resistenti, in rosso sono omozigoti per i marcatori suscettibili e in giallo sono eterozigoti. In blu sono rappresentate le zone dove sono localizzati i crossing over.

Tab. 3). Test Tukey utilizzando le medie delle tre popolazioni utilizzate per il “fine mapping” del *Ol-qt12*.

Popolazione	Numero individui	D.I.		
		a	b	c
22	40	1.18		
121	40		1.8275	
103	40			2.4
Significatività		0.120407	0.0712	0.201295

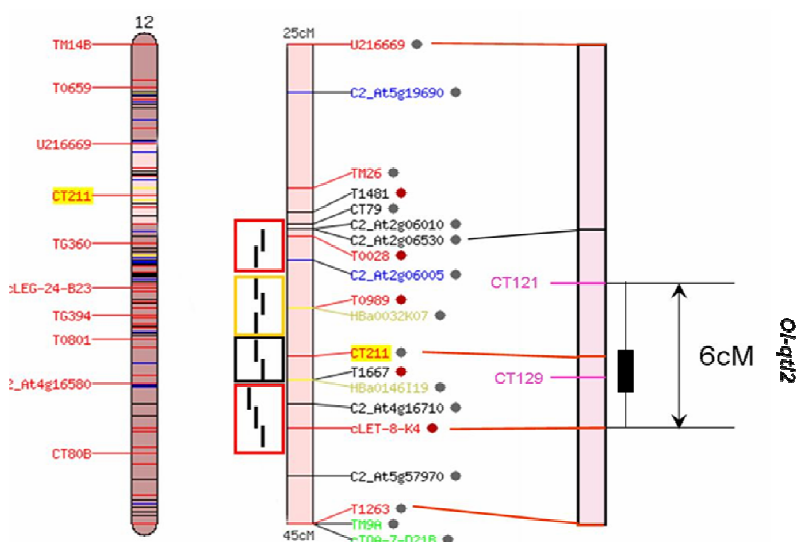


Fig. 8) Confronto tra la mappa genetica EXPEN2000 del SGN database (<http://www.sgn.cornell.edu>) a sinistra e la mappa di associazione derivante dall'incrocio *S. lycopersicum* x *S. neorickii*. Nella mappa EXPEN2000 sono identificati i singoli contig dei BAC per le zone identificate dai marcatori. In giallo sono riportati i “seed” BAC per i singoli marcatori associati

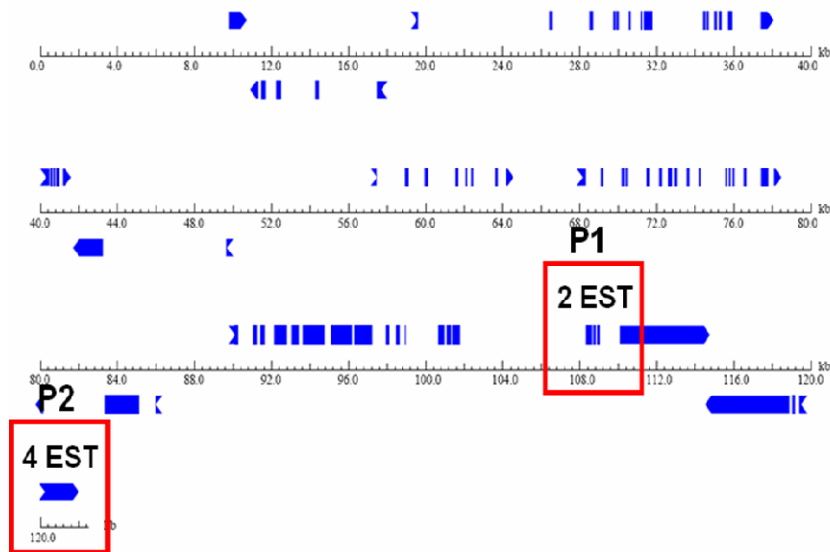


Fig. 9) Annotazione del BAC C12\_Hba146I19. La linea nera rappresenta la sequenza del BAC e i box blu rappresentano le possibili zone espresse. Nei box rossi sono rappresentate le regioni dal BAC che allineano con differenti EST coinvolte nel processo di resistenza. Le regioni sono state rinominate P1 e P2. La regione P1 allinea con due EST differenti mentre la regione P2 con 4 distinte EST. Tutte e 6 le EST hanno omologia con i geni *Cf* di resistenza a *Cladosporium Fulvum*.

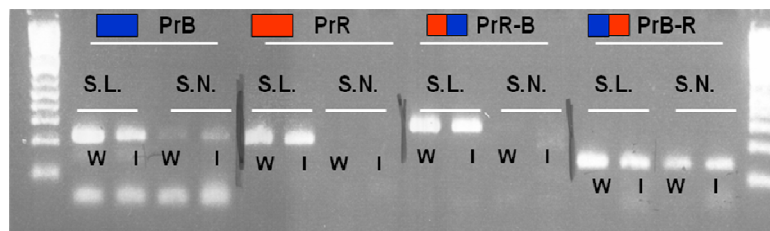


Fig. 10) Analisi PCR su cDNA estratto da piante F1BC2 con l'allele di resistenza al Ol-qt12 (S.N.) e con l'allele di suscettibilità allo stesso locus (S.L.). L'analisi è stata condotta con due coppie di primer (coppia rossa e coppia blu) specifiche per regione P2 su piante inoculate con acqua potabile (W) e con il patogeno *O. neolycopersici* trattato con la stessa acqua (I). Il box blu indica l'amplificato derivante dalla coppia di primer blu e il box rosso indica l'amplificato della coppia rossa. I box blu-rosso o rosso-blu indicano la combinazione dei singoli primer.

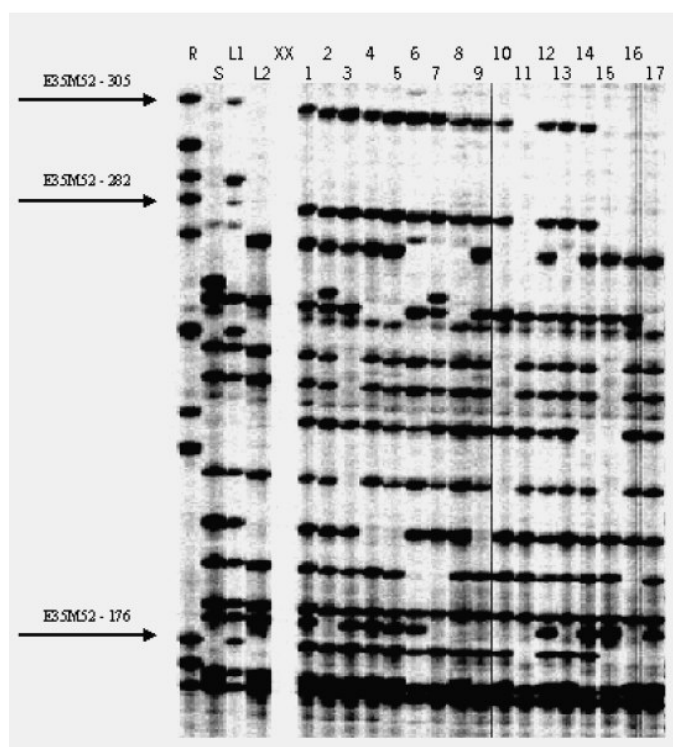


Fig. 11) AFLP “fingerprinting” usando la combinazione di primer E35M52 con il DNA genomico dei due parentali (R:parentale resistente; S: parentale suscettibile), delle due Pre-NIL a differente D.I. (L1: NIL resistente; L2: NIL suscettibile), degli individui nel pool resistente (R-pool, 1-9) e degli individui nel pool suscettibile (S-pool, 10-17). Le frecce indicano la posizione dei marcatori candidati come associati al locus epistatico. I marcatori candidati mostrano lo stesso pattern. Il numero accanto alla combinazione dei primer indica il peso molecolare del frammento.

Tab. 4) Elenco dei marcatori CAPS sviluppati per il locus epistatico mappato al cromosoma 3

Nome	Posizione in cM	Tm	Enzima di restrizione	Origine	
				Tipo	Referenza
TG585 f	40	56	<i>TaqI/DraI</i>	CAPS	SGN
C2_At4g35930 f	52,5	56	-	COSII	“
cLPT-2-E21 r	61	56	<i>RsaI</i>	RFLP	“
C2_At5g38880 f	76	56	<i>AluI</i>	COSII	“
C2_At5g63460 f	83,3	56	<i>Bme1390I</i>	COSII	“
tg599	85	56	<i>Bst</i>	RFLP	“
C2_At5g52820 f	89	56	<i>DraI</i>	COSII	“
C2_At3g47990 r	101	56	<i>HinfI</i>	COSII	“
C2_At1g74520 r	113	56	-	COSII	“
SN280	-	60	<i>AluI</i>	AFLP	-

\*SGN data base (<http://www.sgn.cornell.edu>)

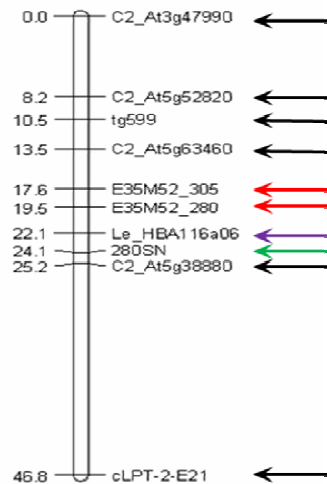


Fig. 12) Mappa di associazione per il locus epistatico al cromosoma 3 di pomodoro prodotta utilizzando la popolazione F2 *S. lycopersicum* x *S. neorickii*. Le frecce nere indicano i i marcatori CAPS prodotti dalle sequenze derivate dall'SGN database (<http://www.sgn.cornell.edu>); in rosso sono indicati i marcatori AFLP associati al locus epistatico; in verde è indicato il marcatore AFLP convertito in CAPS associato al locus epistatico; la freccia viola indica il marcatore CAPS BAC-specifico localizzato al locus epistatico

### SSH *Phytophthora infestans*

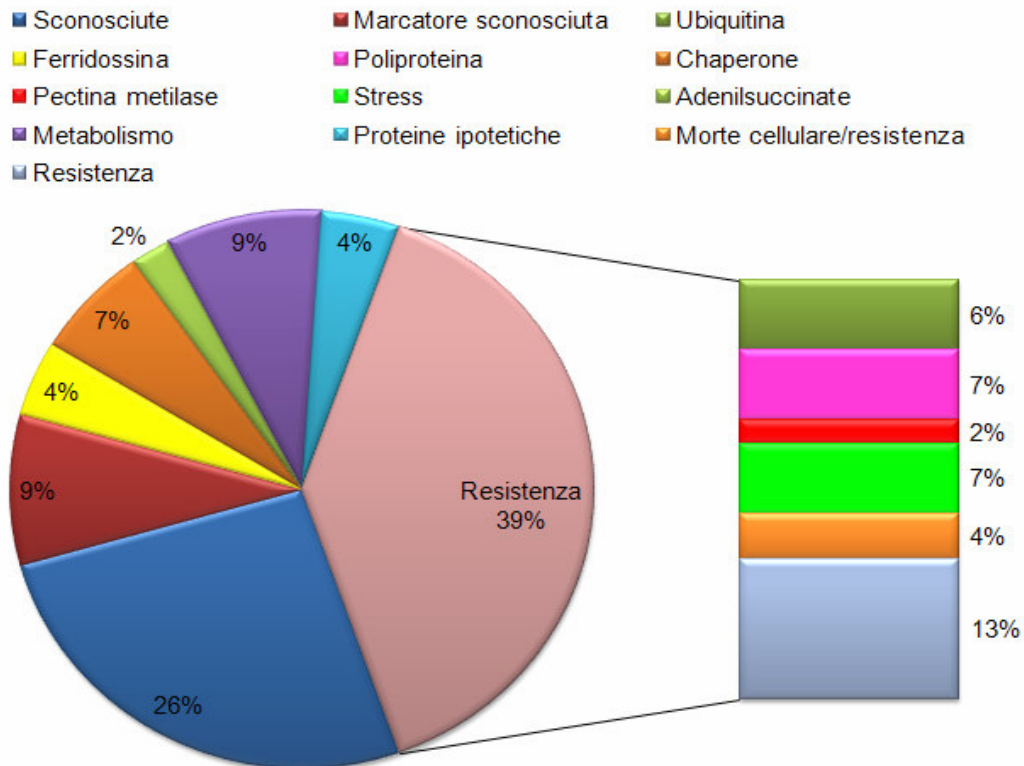


Fig. 13) Raggruppamento per categoria funzionale dei geni isolate nella libreria sottrattiva tra la reazione di resistenza e suscettibilità in seguito all'inoculo di piante di pomodoro trasformate con il gene *R1* di resistenza a *Phytophthora infestans* razza 1

Tab. 6) geni utilizzati per determinare il corso della malattia

Gene	Sequenza primer	Commento
Pr1	AATTGTGGGTGTCCGAG AGG CTGAGTTGCGCCAGACT ACTT	L'espressione può essere usata come marker per le difese mediate da SA
PAL	CGCCCTTGAAACCATAG TCC GAGGCTGCTGCTATTAT GGAAC	

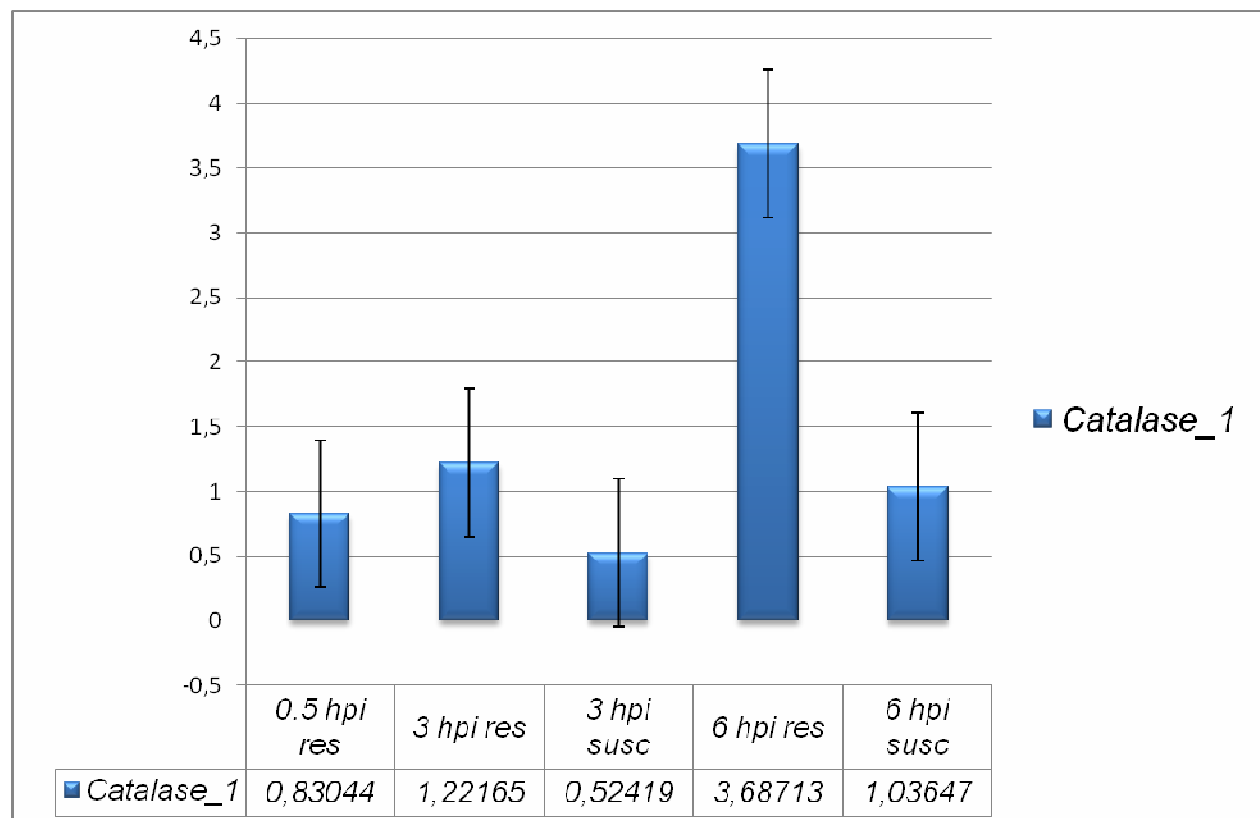


Fig. 14) Espressione del gene *Catalase\_1* per i tre time point nelle reazioni di resistenza (res) e suscettibilità (susc) a differenti ore dopo l'inoculo (hpi)



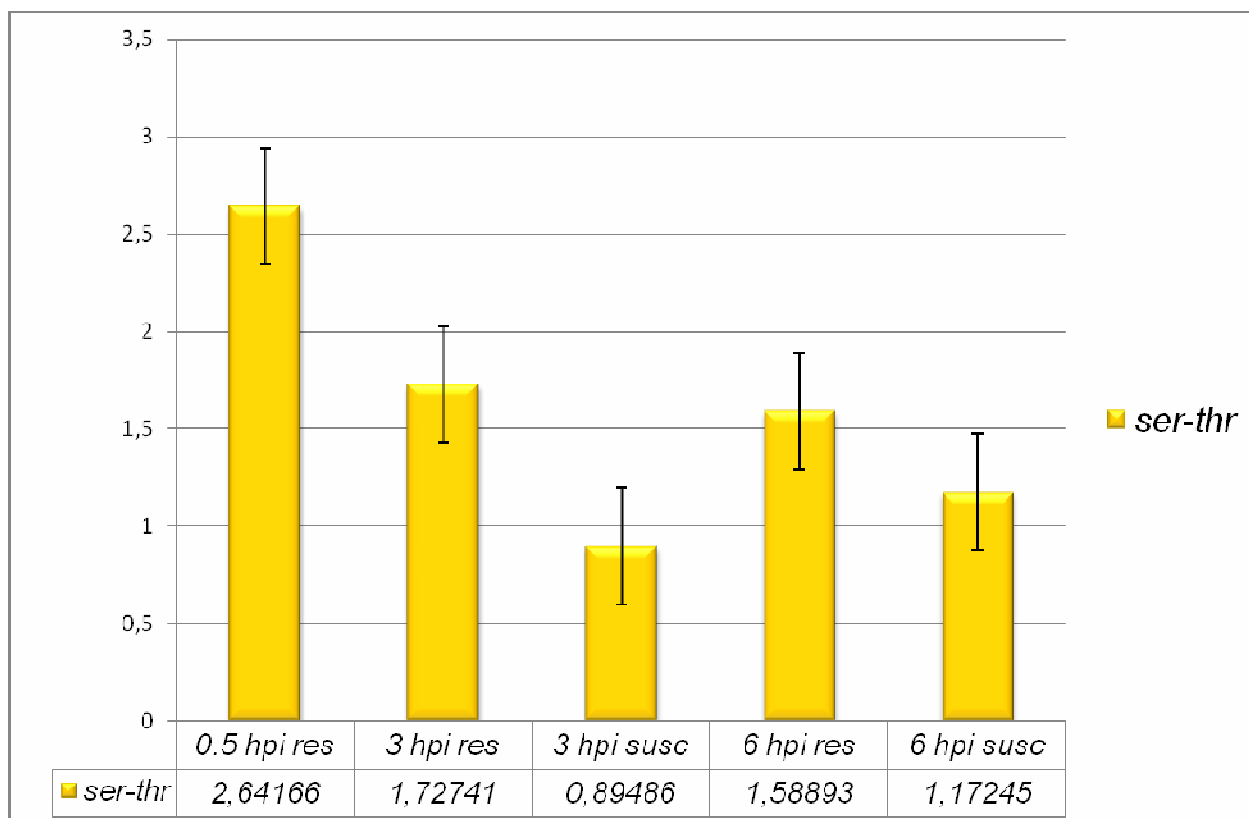


Fig. 14) Espressione del gene *Ser\_Thr protein kinasi* per i tre time point nelle reazioni di resistenza (res) e suscettibilità (susc) a differenti ore dopo l'inoculo (hpi)

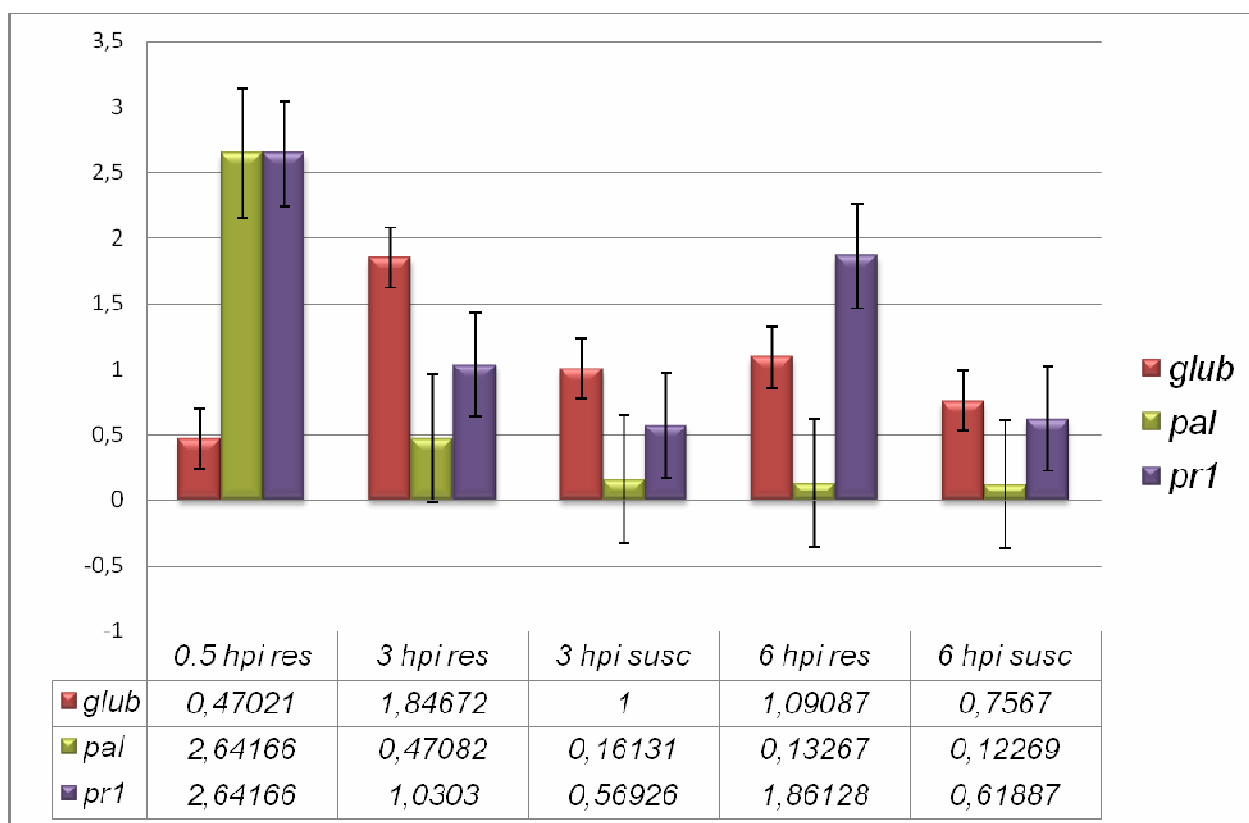


Fig. 15) Espressione del gene *Beta-glucosidase (glub)* (barra marrone) per time point 0,5-3-6 ore dopo l'inoculo nella reazione di resistenza e 3-6 ore dopo l'inoculo nella reazione di suscettibilità. L'espressione genica è stata confrontata con i geni *pr1* (barra viola) e *pal* (barra verde) in tutte e 5 le interazioni

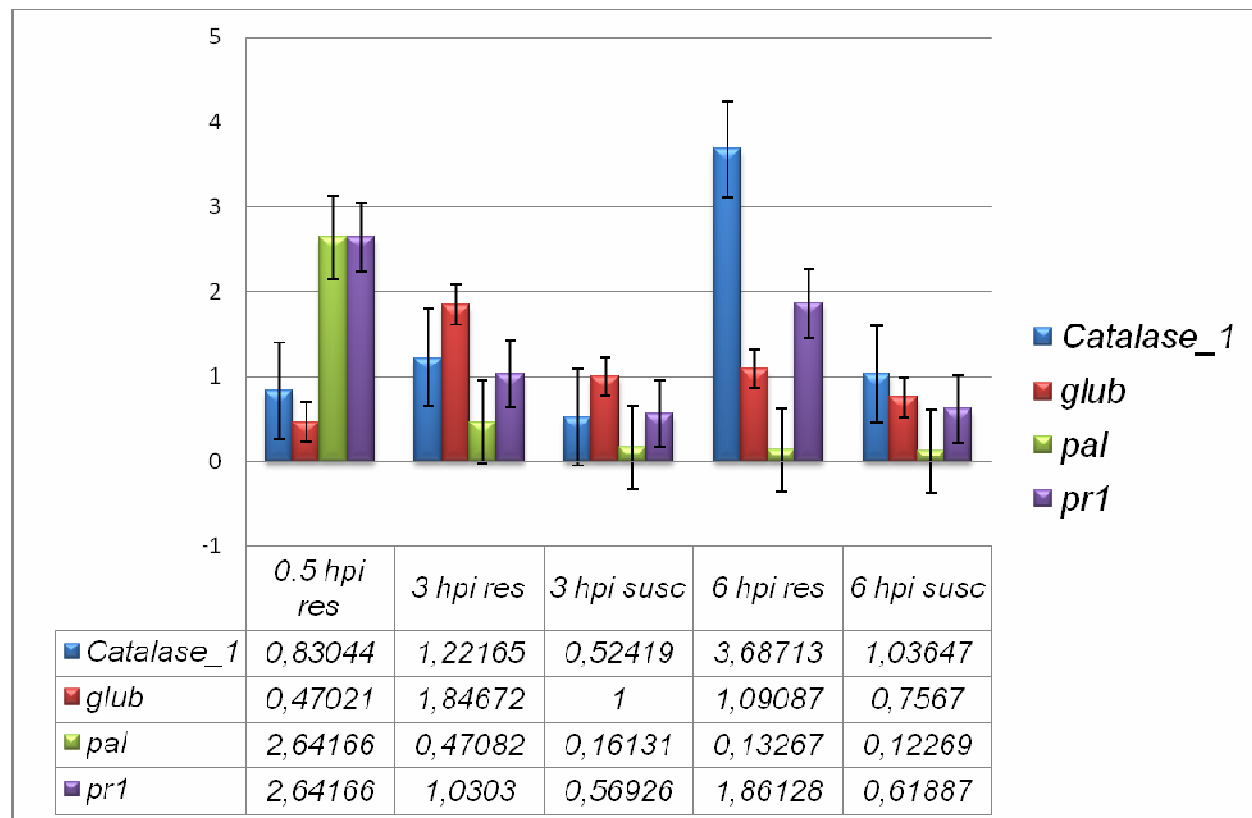


Fig. 16) Confronto tra le espressioni geniche dei geni *glub*, *pr1* e *pal* ai vari time point e il gene *Catalase\_1*

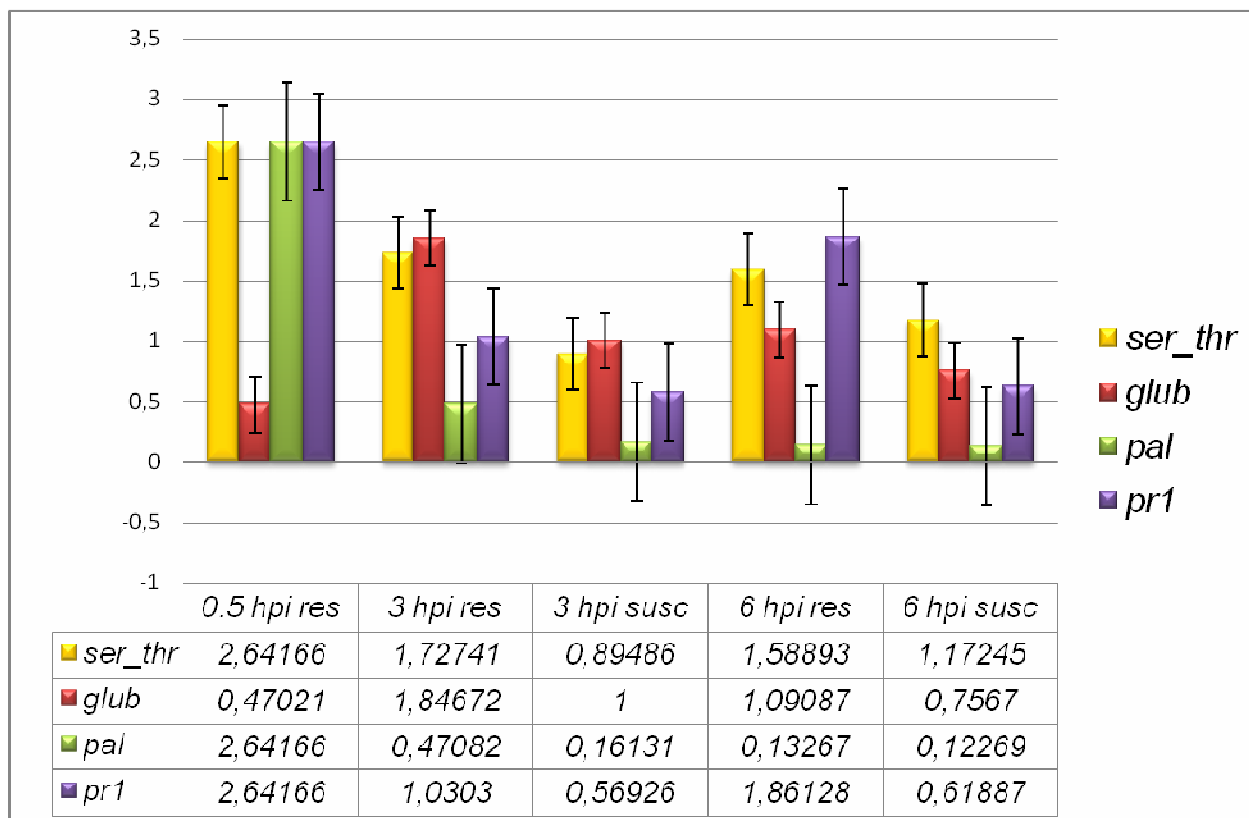


Fig. 16) Confronto tra le espressioni geniche dei geni *glub*, *pr1* e *pal* ai vari time point e il gene *ser-thr protein kinase*

**Abramovitch R.B and Martin G.B** (2004) Strategies used by bacterial pathogens to suppress

plant defenses. *Curr Opin Plant Biol.* 2004, 7(4):356-64

**Asins M. J** (2002) Review present and future of quantitative trait locus analysis in plant breeding. *Plant Breeding* 2002, 121: 281—291

**Bai Y, Huang C.C, Hulst R.G.M. van der, Meijer-Dekens R.G, Bonnema A.B, Lindhout W.H** (2003) QRLs for tomato powdery mildew resistance (*Oidium lycopersici*) in *Lycopersicon parviflorum* G1.1601 co-localize with two qualitative powdery mildew resistance genes.

*Molecular Plant-Microbe Interactions* 2003, 16: 169 - 176

**Bai Y, van der Hulst R, Bonnema G, Marcel T.C, Meijer-Dekens F, Niks R.E and Lindhout P** (2005) Tomato defense to *Oidium neolycopersici*: dominant Ol genes confer isolatedependent

resistance via a different mechanism than recessive *ol-2*. *Mol. Plant Microbe Interact* 2005 18:354—362

**Bendahmane A, Kankuka K, Baulcombe D.C** (1997) High resolution genetical and physical mapping of the Rx gene for extreme resistance to potato virus X in tetraploid potato.

*Theor. Appl. Genet* 1997, 95:153-162

**Bernal A.J, Pan Q, Pollack J, Rose L, Kozik A, Willits N, Luo Y, Guittet M, Kochetkova E,**

**and Michelmore R.W** (2005) Functional Analysis of the Plant Disease Resistance Gene Pto Using

DNA Shuffling. *J. Biol. Chem.* 2005, 280(24):23073-23083.

**Bonierbale M. W, Plaisted R.L, Tanksley S.D** (1998) RFLP Maps Based on a Common Set of Clones Reveal Modes of Chromosomal Evolution in Potato and Tomato. *Genetics* 1988, 120(4):1095–1103.

**Bogdanove AJ.** (2002) Protein-protein interactions in pathogen recognition by plants. *Plant Molecular Biology* 50:981–989

**Bovenhuis H, van Eeuwijk F, Gort G, de Jong M** (2006) Modern statistics for life science. Reader, Wageningen university, The Netherlands.

**Budiman M.A, Chang S.B, Lee S, Yang T.J, Zhang H.B, de Jong H, Wing R.A** (2004) Localization of jointless-2 gene in the centromeric region of tomato chromosome 12 based on high resolution genetic and physical mapping. *Theor Appl Genet* 2004, 108:190–196

**Chang J.H, Tai Y.S, Bernal A.J, Lavelle D.T, Staskawicz B.J, Michelson R.W** (2002) Functional analyses of the Pto resistance gene family in tomato and the identification of a minor resistance determinant in a susceptible haplotype. *Mol Plant Microbe Interact.* 2002, 15(3):281-91.

**Chunwongse J, Doganlar S, Crossman C, Jiang J, Tanksley S,D** (1997) High-resolution genetic map of the Lv resistance locus in tomato. *Theor Appl Genet* 1997, 95: 220-223

**Ciccarese, Amenduni, Schiavone & Cirulli** (1998) Occurrence and inheritance of resistance to powdery mildew (*Oidium lycopersici*) in *Lycopersicon* species. *Plant Pathology* 1998, 47 (4):417-419

**Cong et al.** (2002) Natural alleles at a tomato fruit size quantitative trait locus differ by heterochronic regulatory mutations, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002, 99:13606–13611.

**Culverhouse R, Klein T, Relling M, Shannon W** (2004) Detecting epistatic interactions contributing to quantitative traits. *Genetic Epidemiology* 2004, 27: 141–152

40

**Custer J** (2007) Engineering disease resistance in plants. Ph.D thesis, Wageningen University, The Netherlands.

**Eshed Y and Zamir D** (1996) Less-than-additive epistatic interactions of quantitative trait loci in tomato. *Genetics* 1996, 143:1807-1817

**El-Din El-Assal et al.** (2001) A QTL for flowering time in *Arabidopsis* reveals a novel allele of *CRY2*, *Nat. Genet.* 2001, 29:435–440.

**Fridman et al.** (2004) Zooming in on a quantitative trait for tomato yield using interspecific introgressions, *Science* 2004, 305:1786–1789.

**Fulton T, van der Hoeven R, Eannetta N, Tanksley S** (2002). Identification, Analysis and Utilization of a Conserved Ortholog Set (COS) Markers for Comparative Genomics in Higher Plants. *The Plant Cell* 2002, 14:1457-1467

**Gebhardt C and Valkonen J.P.T** (2001) Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Ann Rev Phytopathol* 2001, 39:79-102

**Gibson G, and Muse S V** (2002) A primer of genome science. Sinauer Associates, Sunderland, Mass

**Grube R.C, Radwanski E.R, Jahn M** (2000) Comparative genetics of disease resistance within Solanaceae. *Genetics* 2000, 155: 873–887

**Heath M.C** (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant molecular Biology* 2000, 44: 321-334

**Huang C.C, Cui Y.Y, Weng C.R, Zabel P, Lindhout P** (2000a) Development of diagnostic PCR markers closely linked to the tomato powdery mildew resistance gene *Ol-1* on chromosome 6. *Theor. Appl. Genet* 2000. 101:918-924

**Huang C.C, Groot T, Meijer-Dekens F, Niks R.E and Lindhout P** (1998) The resistance to powdery mildew (*Oidium lycopersicum*) in *Lycopersicon* species is mainly associated with hypersensitive response. *European Journal of Plant Pathology* 1998, 104: 399–407.

**Huang C.C, Van de Putte P.M, Haanstra-van der Meer J.G, Meijer-Dekens F, Lindhout P** (2000b) Characterization and mapping of resistance to *Oidium lycopersicum* in two *Lycopersicon* *hirsutum* accessions: Evidence for close linkage of two Ol-genes on chromosome 6. *Heredity* 2000, 85:511-520

**Hyne V, Kearsey M.J, Pike D.J, Andsnape J.W** (1995) QTL analysis: unreliability and bias in estimation procedures. *Mol. Breed.* 1995, 1: 273-282

**Jafary H** (2006) Barley-Puccinia rust: a model system to study the genetics, evolution and mechanisms of non-host immunity in plants. PhD thesis Wageningen University, The Netherlands

**Jansen RC** (1993) Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* 1993, 135:205–211.

**Jansen R.C and Stam P** (1994) High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics* 1994, 136:1447–1455.

**Johal G, Briggs S** (1992) Reductase activity encoded by the HM1 disease resistance gene in maize. *Science* 1992, 258: 985-987

**Jones DA, Thomas C.M, Hammond-Kosack K.E, Balint-Kurti P.J, Jones, J.D.G** (1994) Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* 1994, 266:789-793

41

**Jones N, Ougham H, and Thomas H** (1997) Markers and mapping: We are all geneticists now. *New Phytol.* 1997, 137:165-177

**Jones H , Whipps J. M & Gurr S. J** (2001) The tomato powdery mildew fungus *Oidium neolycopersici*. *Molecular Plant Pathology* 2001, 2 (6), 303-309.

**Kao C, Zeng Z, Teasdale R** (1999). Multiple interval mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 1999, 152:1203 -1216

**Ku H.M, Liu J, Doganlar S, Tanksley S.D** (2001) Exploitation of *Arabidopsis*-tomato synteny

to construct a high-resolution map of the *ovate*-containing region in tomato chromosome 2. *Genome* 2001, 44:470–475

**Lefebvre V, Daubeze A.M, Van der Voort R.J, Peleman J, Bardin M, Palloix A** (2003) QTLs for resistance to powdery mildew in pepper under natural and artificial infections. *Theoretical and Applied Genetics* 2003, 107:661–666

**Leister D, Kurth J, Laurie D.A, Yano M, Sasaki T, Devos K, Graner A, Schulze-Lefert P** (1998). Rapid reorganization of resistance gene homologues in cereal genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95:370-375

**Li C** (2005) Transcriptional, microscopic and macroscopic investigations into monogenic and polygenic interactions of tomato and powdery mildew. Ph.D thesis, Wageningen University 2005, The Netherlands

**Li Y, Kao C.H, Davis G, Teasdale R** (1999) Comparison of three QTL detection methods when two QTL are linked on the same chromosome with different effects and markers spacing. *Plant and Animal Genome VII conference* 1999

**Lindhout P, Pet G, Van der Beek H** (1994a) Screening wild *Lycopersicon* species for resistance to powdery mildew (*Oidium lycopersicum*) *Euphytica* 1994, 72:43-49

**Lindhout P, Van der Beek H, Pet G** (1994b) Wild *Lycopersicon* species as sources for resistance to powdery mildew (*Oidium lycopersicum*): Mapping of resistance gene *Ol-1* on chromosome 6 of *Lycopersicon hirsutum*. *Acta Horti* 1994. 376:387-394

**Liu et al.** (2002) A new class of regulatory genes underlying the cause of pear-shaped tomato fruit, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002, 99:13302–13306.

**Martin G, Brommonschenkel S, Chunwongse J, Frary A, Ganai M, Spivey R, Wu T, Earle E, Tanksley S** (1993) Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 1993, 262:1432-1436

**McDowell J.M and Woffenden B.J** (2003) Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *Trends in Biotech.* 2003, 21:178-182.

**Michelmore R.W, Paran I, Kesseli R.V** (1991) Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88: 9828–9832

**McMullen M.D, Snook M, Lee E.A, Byrne P.F, Kross H, Musket T.A, Houchins K, Coe Jr. E.H** (2001) The biological basis of epistasis between quantitative trait loci for flavone and 3-deoxyanthocyanin synthesis in maize (*Zea mays* L.) *Genome* 2001, 44:4-667-676

**Nelson M.R, Kardia S.L, Ferrell R.E** (2001) A combinatorial partitioning method to identify multilocus genotypic partitions that predict quantitative trait variation. *Genome Res* 2001, 11:458–470

**Niks N.E and Linhout P** (2000) Breeding for resistance against disease and pests. Breeding for Resistance. Readers Wageningen University, The Netherlands.  
42

**Niks R.E, Rubiales D** (2002) Potentially durable resistance mechanisms in plants to specialised

fungal pathogens. *Euphytica* 2002, 124:201-216

**Oh K.C, Hardeman K, Ivanchenko M.G, Ellard-Ivey M, Nebenführ A, White T.J, Lomax T.L** (2002) Fine mapping in tomato using microsynteny with the *Arabidopsis* genome: the *Diageotropa* (*Dgt*) locus. *Genome Biol* 2002, 3:49.1-49.11

**Olmstead R.G and Palmer J.D** (1997) Implications for the Phylogeny, Classification, and Biogeography of *Solanum* from cpDNA Restriction Site Variation. *Systematic Botany* 1997, 22(1):19-29

**Osterberg et al.** (2002) Naturally occurring indel variation in the *Brassica nigra* COL1 gene is

associated with variation in flowering time, *Genetics* 2002, 161:299–306.

**Peleman J** (2005) Reverse QTL mapping (RQM), an efficient approach for high resolution mapping of QTL. Plant and animal genome XIII conference 2005

**Price A.H** (2006) Believe it or not, QTLs are accurate. *Trends in Plant Science* 2006, 11(5):213

- 217

**Rana D, van den Boogaart T, O'Neill C.M, Hynes L, Bent E, Macpherson L, Park J.Y, Lim**

**Y.P, Bancroft I** (2004) Conservation of the microstructure of genome segments in *Brassica napus* and

its diploid relatives. *Plant J.* 2004, 40:725–733.

**Rozen S and Skaletsky H.J** (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist

programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in*

*Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, 365-386

Source code available at <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>.

**Salmeron J.M, Oldroyd G.E.D, Rommens C.M.T, Scofield S.R, Kim H.S, Lavelle D.T, Dahlbeck D, Staskawicz B. J** (1996) Tomato Prf is a member of the leucine-rich repeat class of plant

disease resistance genes and lies embedded with in the Pto kinase gene cluster. *Cell* 1996, 86: 123-133,

1996.

**Salvi S, Tuberosa R** (2005) To clone or not to clone plant QTLs : present and future challenges. *Trends plant sci.* 2005, 10: 297-304

**Shen X, Zhou M, Lu W, Ohm H** (2003b) Detection of *Fusarium* head blight resistance QTL in

a wheat population using bulked segregant analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 2003, 106:1041–

1047

**Simko et al.** (2004) Linkage disequilibrium mapping of a *Verticillium dahliae* resistance quantitative trait locus in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) through a candidate gene approach,

*Theor. Appl. Genet.* 2004, 108:217–224.

**Tanksley SD** (1993) Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics* 1993, 27:205-233



**Tanksley S.D, Ganai M.W, Prince J.P, de Vicente M.C, Bonierbale M.W, Broun P, Fulton T.M, Giovannoni J.J, Grandillo S, Martin G.B** (1992) High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 1992, 132:1141–1160

**Tanksley S.D, and Nelson J. C** (1996) Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. *Theor. Appl. Genet* 1996, 92:191—203

**Thornsberry et al.** (2001) *Dwarf8* polymorphisms associate with variation in flowering, *Nat. Genet.* 2001, 28:286–289.

**Van Der Voort J.R, Kanyuka K, Van Der Vossen E, Bendahmane A, Mooijman P, Klein-Lankhorst R** (1999) Tight physical linkage of the nematode resistance gene Gpa2 and the virus resistance gene Rx on a single segment introgressed from the wild species *Solanum tuberosum* subsp. andigena CPC1673 into cultivated potato. *Mol. Pl.-Microbe Interact* 1999, 12:197-206

**Van der Vossen E, Rouppe van der Voort J, Kanyuka K, Bendahmane A, Sandbrink H, Baulcombe D.C, Bakker J, Stiekema W, Lankhorst R.K** (2000) Homologues of a single-resistance gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and a nematode. *The Plant Journal* 2000, 23(4):1-11

**Van Ooijen, J.W** (1992) Accuracy of mapping quantitative trait loci in autogamous species. *Theor. Appl. Genet* 1992, 84: 803-811

**Van Ooijen J.W and Voorrips R.E** (2001) JoinMap® 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, The Netherlands.

**Van Ooijen J.W** (2004) MapQTL® 5, Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations. Plant Research International, Wageningen, The Netherlands.

**Verzaux E** (2005) (3-1)+Synergy=complete resistance – About resistance to tomato powdery mildew. Unpublished, MSc thesis, Wageningen University.

**Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M** (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 1995, 21:4407–4414.

**Werner et al.** (2005) Quantitative trait locus mapping and DNA array hybridization identify an FLM deletion as a cause for natural flowering-time variation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005, 102:2460–2465

**Whipps JM, Budge SP, Fenlon JS** (1998) Characteristics and host range of tomato powdery mildew. *Plant Pathol* 1998, 47:36–48.

**Yaghoobi J, Kaloshian I, Wen Y, Williamson V.M** (1995) Mapping a new nematode

resistance locus in *Lycopersicon peruvianum*. Theor Appl Genet 1995, 91:457-464

**Yaghoobi J, Yates J.L, Williamson V.M** (2005) Fine mapping of the nematode resistance gene. *Mi-3* in. *Solanum. peruvianum* and construction of a *S. lycopersicum* DNA contig spanning the locus. Molecular Genetics and Genomics 2005, 274(1):60-69

**Yi N, Yandell B.S, Churchill G.A, Allison D.B, Eisen E.J, Pomp D** (2005) Bayesian model selection for genome-wide epistatic QTL analysis. Genetics 2005, 170:1333-1344.

**Zeng Z. B** (1993) Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993, 90:10972–10976

**Zhang L, Khan A, Niño-Liu D, Foolad M.R** (2002) A molecular linkage map of tomato displaying chromosomal locations of resistance gene analogs identified based on a *Lycopersicon esculentum* x *L. hirsutum* cross. Genome 2002, 45:133-146.

**Zhu S, Leonard K.J, Kaeppler H.F** (2003) Quantitative trait loci associated with seedling resistance to isolates of *Puccinia coronata* in oat. Phytopathology 2003, 93(7):860-866

Activity:

**October 2006:** European PLANT GEM's meeting – Venezia- 10/15 October 2006

**November 2006 until October 2007:** worked in a Plant Breeding department at the Wageningen University – The Netherlands – under the supervision of Dr Bai and Prof Visser. The project was the study of minor genes in the interaction *Oidium neolycopersici* vs. resistant wild species of tomato

**July 2007:** XIII international congress of molecular plant-microbe interactions – Sorrento- 21/27 July 2007

**November 2006 until October 2007:** followed all the seminar at the Plant Breeding department

Publications:

Benyamin Houshyani, **Luigi Faino**, Qingdao Zou, Estelle Verzaux, Maria Raffaella Ercolano, Richard Visser and Yuling Bai (2007) Epistasis detected in fine-mapping QTLs for resistance to tomato powdery mildew, *Oidium neolycopersici*. In XIII International congress of Molecular Plant-Microbe Interactions – Sorrento- 21/27 July 2007

**L. Faino**, W. Sanseverino, A. Testa, G. Cristinzio, D. Carputo, L. Frusciante, M.R. Ercolano (2007) Transformation and functional characterization of potato R1 resistance gene to *Phytophthora infestans* in tomato plants. In XIII International congress of Molecular Plant-Microbe Interactions – Sorrento- 21/27 July 2007